ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1981 Nº 106

LES BENZODIAZEPINES SONT-ELLES CARCINOGENES ?

Etude chez le rat
par des tests de carcinogénèse
à moyen terme

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLOME D'ÉTAT

Présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

BERNARD REMANDET

Né le 11 Novembre 1953 à TOURNUS (Saône et Loire)

Jury :
Président : M. COMBES, professeur à l'Université Paul-Sabatier, Toulouse
Assesseur : M. VAN HAVERBEKE, professeur à l'Ecole vétérinaire, Toulouse
Assesseur : M. CABANIE, professeur à l'Ecole vétérinaire, Toulouse

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543924_0058

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1981 Nº 106

LES BENZODIAZEPINES SONT-ELLES CARCINOGENES ?

Etude chez le rat
par des tests de carcinogénèse
à moyen terme

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLOME D'ÉTAT

Présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

BERNARD REMANDET

Né le 11 Novembre 1953 à TOURNUS (Saône et Loire)

Jury :
Président : M. COMBES, professeur à l'Université Paul-Sabatier, Toulouse
Assesseur : M. VAN HAVERBEKE, professeur à l'Ecole vétérinaire, Toulouse
Assesseur : M. CABANIE, professeur à l'Ecole vétérinaire, Toulouse

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

DIRECTEUR . . . . . M. LAUTIE
DIRECTEUR HONORAIRE . . . . . M. FLORIO
PROFESSEURS HONORAIRES . . . . . MM. BRIZARD
BERTHELON
SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire . . . . . M. GODFRAIN
Professeur sans chaire. . . . . Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MÉDICALES

Professeur titulaire . . . . . MM. RICO
Professeur sans chaire. . . . . BRAUN
Maître-Assistant. . . . . BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire . . . . . MM. PAVAUX
Maître-Assistant. . . . . LIGNEREUX
Maître-Assistant. . . . . SAUTET

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

Professeur titulaire . . . . . MM. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire. . . . . FARGEAS
Maître-Assistant. . . . . TOUTAIN

Physiologie - Thérapeutique
et Pharmacodynamie

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire . . . . . MM. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire. . . . . CABANIE
Maître-Assistant Agrégé . . . . . MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire . . . . . MM. LABIE
Maître de Conférences, non Chef de Service. . EECKHOUTTE
Maître-Assistant Agrégé . . . . . Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des Denrées Alimentaires d'Origine Animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire . . . . . MM. DORCHIES
Maître de Conférences, non Chef de Service. . FRANC
Maître-Assistant. . . . . DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MÉDICALE DES ÉQUIDÉS ET CARNIVORES

Professeur titulaire . . . . . MM. LESCURE
Maître de Conférences, non Chef de service . . GUELFI
Maître-Assistant. . . . . REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Équidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MÉDICALE DU BÉTAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire . . . . . MM. TOURNUT
Maître de Conférences, non Chef de service . . BEZILLE
Maître Assistant. . . . . JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de Basse-Cour
Clinique - Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire . . . . . MM. CAZIEUX
Maître-Assistant Agrégé . . . . . GENEVOIS
Maître-Assistant. . . . . AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale
Technique Chirurgicale - Pathologie Chirurgicale - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire . . . . . MM. FERNEY
Professeur sans chaire. . . . . ROYAL
Maître-Assistant Agrégé . . . . . TAINTURIER

Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction - Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES LÉGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire . . . . . MM. CHANTAL
Maître de Conférences, non Chef de service . . GANIERE
Maître-Assistant. . . . . PICAVET

Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GÉNÉRALE MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire . . . . . MM. LAUTIE
Maître-Assistant. . . . . PELLERIN

Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ÉCONOMIE RURALE

Professeur titulaire . . . . . MM. QUEINNEC
Professeur sans chaire. . . . . DARRE
Maître-Assistant. . . . . Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique appliquée
Hygiène Générale - Zootechnie - Élevage
Économie Générale et des Productions Animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire . . . . . MM. FALIU
Professeur sans chaire. . . . . GRIESS

Botanique appliquée et bromatologie
Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, AUVERGNAT, BLANC, BOURBON, COMBES, COMBRET, GROS, FERNET, LE BIHAN, MAZENC, RIVES.

La Faculté et l'École déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 Mai 1891 et du Conseil de l'École en date du 13 Juin 1924).

A tous ceux qui me sont chers.

A tous ceux du Centre de Recherches Clin-Midy de Montpellier qui ont participé à l'élaboration de cette thèse,
et à Monsieur le Docteur G. M. WILLIAMS de la Fondation Américaine pour la santé, pour ses conseils.

Remerciements

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur COMBES
de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

qui nous a fait l'honneur
d'accepter d'être le Président
de notre jury de thèse.

A notre jury de thèse

Monsieur le Professeur VAN HAVERBEKE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Hommages respectueux.

Monsieur le Professeur CABANIE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Hommages respectueux.

PLAN

INTRODUCTION..... 3

PREMIERE PARTIE : Place des tests à moyen terme in vivo dans les études de carcinogénèse 4

A. Définition des carcinogènes chimiques..... 4
1. Critères de détermination et définitions :
a) Critères de détermination 4
b) Définitions 4
c) Limites 4
2. Classification 4
B. Place des tests à moyen terme..... 6
1. Avantages et limites des tests à long terme..... 6
2. Avantages et limites des tests à court terme in vitro..... 6
3. Place des tests à moyen terme..... 7
a) Stratégies des études de carcinogénèse..... 7
b) Importance de la structure de l'agent carcinogène 8
c) Avantages des tests à moyen terme 8
C. Choix des tests à moyen terme..... 8
D. Eléments d'appréciation de la carcinogénèse sur le foie de rat
1. Critères morphologiques..... 8
a) Foyers ou zones d'altérations cellulaires 8
b) Nodules néoplasiques..... 9
c) Lésions associées 9
2. Critères histochimiques..... 9

DEUXIEME PARTIE. Protocoles des études à moyen terme in vivo utilisées 10

A. Bases de ces expérimentations..... 10
1. Initiation 10
2. Promotion..... 10
B. Animaux..... 10
1. Caractéristiques :
Souche, sexe, poids, nombre, identification..... 10
2. Entretien..... 11
Alimentation, abreuvement, environnement 11
C. Produits administrés 11
1. Nature : N-2-Fluorenylacetamide, Phénobarbital, Diazépam, Clorazépate dipotassique, Oxazépam, Lorazépam, CM 6912, CM 7120. 11
2. Contrôles analytiques..... 13
3. Administration 13
D. Protocole de traitement de l'expérimentation Initiation..... 13
- Répartition en lots, nombre d'animaux par lot, posologie, durée d'administration..... 13
E. Protocole de traitement de l'expérimentation Promotion 13
- Répartition en lots, nombre d'animaux par lot, posologie, durée d'administration..... 14
F. Examens pratiqués..... 15
1. Pesée hebdomadaire 15
2. Sidérose hépatique induite 15
3. Examen anatomopathologique 15
4. Examens biochimiques 16
a) Hépatique 16
b) Plasmatique 16
c) Dosages pratiqués 16

5. Analyse statistique.....

TROISIEME PARTIE : Résultats.....

A. Anatomopathologiques .....
1. Remarques préliminaires.....
a) Critère de sélection des foyers ou zones d'altérations cellulaires .....
b) Effet cytotoxique du FAA.....
c) Prolifération des cellules ovalaires.....
d) Réactivité à la coloration de Perls .....
2. Résultats anatomopathologiques de l'expérimentation Initiation
3. Résultats anatomopathologiques de l'expérimentation Promotion
a) Foyers ou zones d'altérations cellulaires .....
- Lots témoins positifs.....
- Etude par produits testés.....
- Remarques sur la courbe d'établissement des foyers ou zones d'altérations cellulaires .....
b) Nodules néoplasiques.....
- Lots témoins positifs.....
- Etude par produits testés.....
4. Discussion sur les résultats anatomopathologiques.....
a) Validité de ces résultats .....
b) Les Benzodiazépines sont-elles initiatrices ? .....
c) Les Benzodiazépines sont-elles promotrices ?.....
5. Résultats par lots .....
B. Résultats biochimiques .....
1. Gamma Glutamyl transpeptidase.....
a) Lots témoins positifs .....
b) Produits testés .....
c) Analyse de ces résultats.....
2. Phosphatases alcalines, Protéines totales, Glutamate pyruvique transaminase, glutamate oxaloacétique transaminase, lactate deshydrogénase .....
a) Lots témoins positifs .....
b) Produits testés .....
c) Analyse de ces résultats.....
3. Discussion .....
4. Résultats par lots .....

QUATRIEME PARTIE : Corrélations entre les résultats anatomopathologiques et les résultats biochimiques.....

A. Corrélations obtenues à partir des données individuelles .....
B. Analyse en composantes principales .....
1. Représentations graphiques et analyses .....
2. Corrélations des différents paramètres avec les axes principaux d'inertie .....
3. Discussion .....

CONCLUSION.....
BIBLIOGRAPHIE .....

INTRODUCTION

Pour mettre en évidence l'éventuel risque carcinogène qu'une spécialité pharmaceutique présenterait pour l'homme il existe différentes épreuves :

classiquement les autorités de tutelle (6, 30, 31, 50) recommandent la mise en oeuvre d'études destinées à mettre en évidence l'apparition de tumeurs anatomiquement décelables chez l'animal vivant. Ces études sont longues : 24 mois chez le rat, 18 mois chez la souris et le hamster, temps auquel s'ajoute celui des examens histopathologiques. Elles sont très lourdes car elles nécessitent l'entretien, dans des conditions optimales, d'un nombre minimum de 500 animaux pour deux espèces différentes.

Ces études à long terme se révèlent donc très onéreuses pour l'industriel, elles retardent considérablement l'exploitation du médicament s'il se révèle non carcinogène, et inversement elles mobilisent beaucoup de moyens et de temps, inutilement, si en fin de compte le produit testé se révèle carcinogène.

Il est donc apparu nécessaire de disposer de tests de carcinogénèse à plus court terme pour détecter de façon beaucoup plus précoce les risques de carcinogénèse, et tester ainsi un nombre beaucoup plus élevé de substances chimiques (45). Ceci permettrait d'en faire un premier "screening" et de focaliser à meilleur escient les moyens industriels sur les produits les plus intéressants.

Cette appréciation précoce des risques de carcinogénèse est d'ailleurs actuellement effectuée grâce à l'emploi d'une batterie de tests in vitro, mais leur efficacité est limitée.

L'objet de cette thèse est de déterminer, à l'aide de tests de carcinogénèse à moyen terme in vivo (45), l'activité éventuellement carcinogène (génotoxique ou promotrice) de différentes Benzodiazépines. Le premier intérêt de cette recherche est la mise en oeuvre de tests à moyen terme qui permettent en particulier de détecter l'effet promoteur carcinogène. En effet les études de carcinogénèse classiques (à court terme in vitro et à long terme) se révèlent insuffisantes pour la détection des carcinogènes épigénétiques.

Le second intérêt de cette thèse est le choix des Benzodiazépines. Ces médicaments sont des substances à activité neurotrope, caractérisées par une action antidépressive, anxiolytique, ou tranquillisante. Elles sont très largement prescrites dans le monde occidental, il est donc très important d'apprécier le risque de carcinogénèse que pourraient présenter ces médicaments pour les personnes auxquelles on les administre. Se posent donc les questions suivantes : sont-elles carcinogènes ? Et si oui sont-elles génotoxiques ou promotrices ? Ce dernier point est particulièrement débattu à l'heure actuelle en ce qui concerne le Diazépam pour lequel D. F. Horobin (13, 14) semble avoir mis en évidence une activité promotrice carcinogène, ce que réfutent d'autres scientifiques (9, 16, 17).

Dans un premier temps nous situerons les tests à moyen terme dans la stratégie générale des études de carcinogène. Puis nous détaillerons les protocoles d'étude, avant d'exposer l'ensemble des résultats dont une dernière partie tentera de faire la synthèse.

I. PLACE DES TESTS A MOYEN TERME DANS LES ETUDES DE CARCINOGENESE

A. DEFINITION DES CARCINOGENES CHIMIQUES.

1. Critères de détermination et définitions :

a) Critères de détermination :

Un médicament est reconnu carcinogène lorsque son administration à l'animal vivant induit l'apparition de tumeurs histologiquement observables (50), et quand les modalités de l'apparition de ces tumeurs se conforment à l'un ou plusieurs des types de réponse mentionnés ci-dessous (45) :

- augmentation de l'incidence des types de tumeurs observées par rapport aux témoins.
- apparition des tumeurs de façon plus précoce par rapport aux témoins.
- développement de types de tumeurs non observées chez les témoins.
- augmentation de la multiplicité des tumeurs chez l'animal individuel.

Après avoir ainsi posé les critères de reconnaissance d'un carcinogène lors d'études à long terme, il est utile d'en rappeler les définitions classiques :

b) Définitions

- un carcinogène complet est un agent capable de provoquer le processus de cancérogénèse dans son entier.
- un carcinogène initiateur est capable de provoquer le stade précoce de cancérogénèse qui est le stade d'initiation, apparemment irréversible. Il est cependant incapable de provoquer le processus de cancérogénèse dans son entier.
- un agent promoteur est capable d'induire le phénomène de cancérogénèse quand il y a eu déjà initiation du processus tumoral.
- un procarcinogène (ou carcinogène secondaire) n'est carcinogène qu'après biotransformation, donnant à partir de lui un carcinogène ultime. Un carcinogène ultime ou primaire est caractérisé en outre par la présence d'un site hautement électrophile dans sa molécule.
- un agent cocarcinogène augmente la cancérogénécité d'un carcinogène complet quand il est administré en même temps que lui.

c) Limites :

Les tests courts de carcinogénèse ont montré que la cible principale des carcinogènes est l'ADN (6). Ils ont ainsi permis de les séparer en deux grands groupes : ceux qui altèrent l'ADN, et ceux qui ne l'altèrent pas mais qui semblent en fixer les altérations et en favoriser l'expression tumorale. En 1980, Weisburger et Williams (45) ont proposé une nouvelle classification des carcinogènes basée sur leur mode d'action vis à vis de l'ADN (Tableau I).

2. Classification : c.f. tableau I

Les carcinogènes génotoxiques interagissent avec l'ADN, et y provoquent des altérations responsables de modifications géniques. Ceci est en relation avec le fait que la plupart des manifestations néoplasiques expriment une altération génotypique.

bleau I : CLASSIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES CARCINOGENES
'après Weisburger et Williams, 1980)

TYPE	MODE D'ACTION	EXEMPLE
A. Génotoxique		
1. Carcinogène direct ou primaire	Electrophile, composé organique, génotoxique interagit avec l'ADN	Ethylène imine, bis(chlorométhyl) éther
2. Procarcinogène ou carcinogène secondaire	Nécessite une conversion par activation métabolique de la part de l'hôte ou in vitro, pour donner un carcigène du type 1	Vinyl chlorure, Benzo(a)pyrène, 2-naphthylamine diméthylnitrosamine
3. Carcinogène inorganique	N'est pas directement génotoxique, amène des changements dans l'ADN par altération sélective dans la fidélité de réplication de l'ADN	Nickel, chrome
B. Epigénétique		
4. carcinogène solide remanent	mécanisme exact inconnu, d'ordinaire affecte seulement les cellules et tissus mésenchymateux ; prothèse	Lames de plastique polymérisé ou métalliques, amiante
5. Hormone	Ordinairement non génotoxique ; altère principalement l'équilibre endocrinien et la différentiation ; agit souvent comme promoteur	Oestradiol diéthylstilbestrol
6. Immunosuppresseur	Ordinairement non génotoxique ; stimule principalement les néoplasmes "induits viralement", tranplantés, ou métastasiques	Azathioprine, sérum antilymphocytaire
7. Cocarcinogène	Non génotoxique ni carcinogénique, mais augmente l'effet des agents de type 1 ou type 2 quand il est donné en même temps. Peut modifier la conversion de l'agent du type 2 en type 1	Esters de phorbol, pyrène, catéchol, alcool éthylique n-dodécan, SO2
8. Promoteur	Non génotoxique ni carcinogène, mais augmente l'effet de l'agent du type 1 ou du type 2 lorsqu'il est donné consécutivement	Esters de phorbol, phénol, anthraline, acides biliaires, métabolites du tryptophane, saccharine

La structure des composés génotoxiques est caractérisée par la présence d'un site fortement électrophile, ce qui les rend réactants avec l'ADN. On les appelle carcinogènes primaires quand ils interagissent directement avec l'ADN, secondaires quand le démasquage de leur nature génotoxique nécessite une activation métabolique.

Les carcinogènes épigénétiques sont ceux pour lesquels aucune évidence de génotoxicité n'a pu être démontrée. Ils agiraient sur les macromolécules ou l'ARN de cellules préalablement altérées par un carcinogène génotoxique. Ceci aurait pour effet de favoriser l'expression phénotypique de cette altération génique, quand celle-ci est rendue irréversible par l'administration du génotoxique. Pour dévoiler ce phénomène de promotion néoplasique il est donc nécessaire d'initier des altérations de l'ADN.

L'initiation est obtenue à l'aide d'un carcinogène génotoxique quand il est administré de façon suffisante pour altérer l'ADN de manière irréversible, sans toutefois provoquer de manifestation néoplasique de la part des cellules initiées.

B. PLACE DES TESTS A MOYEN TERME :

1. Avantages et limites des tests à long terme.

- Les critères définis en A1a permettent surtout de détecter les carcinogènes génotoxiques complets.
- Les carcinogènes épigénétiques tels que les promoteurs et les cocarcinogènes sont difficilement décelés sur la base de ces seuls critères. Leur démasquage nécessite dans le premier cas une initiation préalable, et dans le second cas l'administration préalable d'un carcinogène initiateur.
- De même un agent carcinogène génotoxique initiateur pur ne pourra pas être décelé si il n'y a pas de phénomène de promotion ou de cocarcinogénèse associé.

Ceci pose les limites des études de carcinogénèse à long terme pour lesquelles il n'existe pas d'a priori sur la nature carcinogénique des produits testés. Détecter les carcinogènes géno- ou épigénétiques, impose déjà d'en soupçonner la nature et d'y adapter la conduite de l'étude.

Un dernier problème lors de ces études à long terme est présenté par les hormones. Il est connu que les hormones peuvent influer sur l'expression des phénomènes tumoraux par un mécanisme qui semble voisin de celui de la cocarcinogène ou de la promotion, en tout cas un mécanisme épigénétique. La connaissance de l'équilibre endocrinien des espèces utilisées pour les études à long terme, et la connaissance des pertubations de cet équilibre, permettraient d'apprécier plus justement la part des hormones dans un processus de cancérogénèse et la part de l'agent génotoxique.

2. Avantages et limites des tests à court terme in vitro :

Ces tests possèdent un grand intérêt pour la détection des carcinogènes génotoxiques primaires, pour lesquels ils apportent une réponse rapide et suffisamment nette quand ils sont employés en batterie.

Ils se révèlent insuffisants pour la détection des carcinogènes secondaires s'ils ne sont pas accompagnés par un système de métabolisation du composé chimique testé, ce qui actuellement est

réalisé dans le test de Ames (1) modifié par Sugimura (45), et dans les tests sur cultures cellulaires en survie tels que le test du "DNA repair" (47) et les tests de mutagénèse sur cellule de mammifère.

Quoiqu'il en soit en cas de résultat positif l'extrapolation à l'organisme de mammifère est délicate, car aucun de ces tests ne reproduit l'environnement homéotasique et immunitaire présent dans un organisme vivant.

De plus aucun des tests couramment employés en batterie ne permet de détecter les carcinogènes épigénétiques.

En conclusion de ces deux paragraphes il apparaît que les études à long terme et les tests courts in vitro présentent plusieurs limites dans l'appréciation du risque de cancérogénèse:

- études à long terme :

non détection des carcinogènes génotoxiques initiateurs purs s'il n'y a pas de phénomène de promotion associé, et non détection des carcinogènes épigénétiques, des promoteurs en particulier, s'il n'y a pas eu initiation au départ. Et dans les cas où ces conditions se trouveraient réalisées fortuitement : à qui attribuer quoi ?

- études à court terme in vitro :

elles ne permettent pas en général de détecter les carcinogènes épigénétiques et ne reproduisent pas l'environnement animal.

3. Place des tests à moyen terme.

a) Devant ces limites il est apparu nécessaire d'élargir la méthodologie de l'appréciation du risque de cancérogénèse. J. H. Weisburger et G. M. Williams (45) ont ainsi proposé une nouvelle stratégie d'appréciation de ce risque en y ajoutant deux points essentiels : la nécessité de bien connaitre la structure chimique du composé testé et de pratiquer des tests à moyen terme in vivo (Tableau II).

Tableau II : STRATEGIE D'EVALUATION DU RISQUE DE CARCINOGENESE (d'après Weisburger et Williams, 1980)

A.	Structure du produit chimique
B.	Tests à court terme in vitro
1.	Mutagénèse bactérienne
2.	Réparation de l'ADN
3.	Mutagénèse sur mammifère
4.	Echange entre chromatides soeurs
5.	Transformation cellulaire
B'.	Niveau de décision : à partir des résultats de A et B
C.	Tests limités in vivo (tests à moyen terme)
1.	Induction de tumeurs cutanées chez la souris
2.	Induction de tumeurs pulmonaires chez la souris
3.	Induction de tumeurs mammaires chez le rat Sprague-Dawley femelle
4.	Induction de foyers d'altération dans le foie de rongeur
C'.	Niveau de décision : à partir des résultats de A, B et C
D.	Etude à long terme in vivo
E.	Evaluation finale : tous les tests.

b) La connaissance de la structure du composé testé peut orienter notablement la conduite des études de carcinogénèse. La suspicion de carcinogénèse est déjà posée quand existe dans la molécule un site fortement électrophile. Le devenir métabolique de cette substance est aussi très important à connaitre car il peut révéler un site électrophile, inexistant sur la molécule initiale. Il est ainsi possible de comprendre la nécessité de disposer de tests présentant des capacités de métabolisation du substrat testé.

De plus la connaissance des voies de métabolisation du substrat permettra de sélectionner parmi les tests à moyen terme proposés celui qui sera le plus approprié.

c) Avantages des tests à moyen terme.

Ils s'effectuent sur des systèmes réactifs limités : une espèce animale, un organe, et ils ont une durée acceptable de plusieurs semaines, 10 au minimum, et n'excèdent pas un an. Ils présentent de plus l'intérêt d'offrir au produit testé un terrain favorable en ce qui concerne le métabolisme, l'environnement homéostasique et immunitaire.

Enfin ils permettent de déterminer la nature du carcinogène: génotoxique complet, génotoxique initiateur, ou épigénétique (promoteur essentiellement) à l'aide de protocoles appropriés.

C. CHOIX DES TESTS A MOYEN TERME:

Les tests à moyen terme qui ont été choisis pour détecter l'activité éventuellement carcinogène des Benzodiazépines, sont des tests d'induction de foyers d'altérations cellulaires et de nodules néoplasiques dans le foie de rongeur et du rat en particulier.

Le choix de ce système réactif a été motivé par la nature des produits de référence utilisés (N-2-Fluorenylacetamide ou FAA et Phénobarbital) et des Benzodiazépines. Le FAA est un carcinogène génotoxique qui provoque l'apparition de tumeurs hépatiques et mammaires chez le rat (45). Le Phénobarbital est un inducteur enzymatique hépatique (24) ainsi que la plupart des Benzodiazépines et en particulier le Diazépam (18).

D. ELEMENTS D'APPRECIATION DE LA CARCINOGENESE SUR LE FOIE DU RAT.

1. Critères morphologiques.

Les foyers d'altérations cellulaires et les nodules néoplasiques apparaissant dans le foie des rats exposés aux carcinogènes ont été décrits en 1980 dans le Journal of National Cancer Institute (10) et par Squire et Lewitt en 1975 (38).

a) Foyers ou zones d'altérations cellulaires.

L'architecture générale de ces foyers est légèrement modifiée par rapport au tissu sain, ils ne compressent pas le parenchyme voisin, ils s'en démarquent par la nature des cellules qui les composent et surtout par les réactions histochimiques de ces cellules. Qand la surface occupée par un foyer est supérieure au lobule hépatique il est qualifié de zone.

Il existe différents types histologiques de foyers (lors de coloration classique à l'hématoxyline-éosine) :

- foyers (ou zones) à cellules claires,
- foyers (ou zones) à cellules acidophiles,
- foyers (ou zones) à cellules basophiles,
- foyers (ou zones) composés d'un assemblage de deux ou de ces trois types cellulaires.

b) Nodules néoplasiques :

Ils sont composés par les types de cellules précédemment cités et sont en outre caractérisés par :

- une architecture interne anarchique,
- une compression du parenchyme voisin, qui s'exprime par un arrangement des travées de ce tissu perpendiculairement au diamètre du nodule, et par un applatissement de ces travées. Ceci traduit la croissance centrifuge du nodule
- l'absence d'espaces portes. Quoique la présence d'espaces portes atrophiques puisse être notée dans quelques nodules, qui les ont englobés lors de leur croissance.

c) Lésions associées.

Ces lésions sont consécutives à l'action du carcinogène, elles n'en sont cependant pas spécifiques et viennent perturber l'interprétation des lésions spécifiques.

- lésions hépatocellulaires régénératives ou nodules de régénération : ils ressemblent aux nodules néoplasiques par leur nature expansive centrifuge, mais n'en ont pas les caractéristiques cellulaires, et possèdent une structure interne peu altérée.
- hyperplasie des canaux biliaires, Adénofibrose ou Cholangiofibrose, et kystes biliaires.
- hyperplasie des cellules ovalaires dont la nature hépatocytaire transitionnelle semble actuellement prouvée (37).

Les nodules de régénération et l'hyperplasie des cellules ovalaires seront décrits plus en détail dans la partie résultats.

2. Critères histochimiques.

En plus de ces aspects morphologiques particuliers visibles en histologie de routine, les foyers ou zones et les nodules présentent plusieurs anomalies permettant leur détection et leur identification. Ces anomalies sont détectables avant la traduction morphologique et sont :

- La présence de gamma glutamyl transpeptidase (GGT) (4, 7, 20, 27), enzyme qui est normalement absente dans le foie du rat adulte, mais présente dans le foie de rat foetal (4), ce qui traduit la dédifférenciation des cellules en évolution néoplasique. Les foyers sont donc GGT positifs ainsi que les nodules néoplasiques.
- une déficience en glucose 6 phosphatase (32, 35).
- une déficience en Adénosine triphosphatase (32).
- une absence de stockage de fer lors de sidérose hépatique induite (43, 46, 48).

Ce dernier paramètre semble être le plus sensible (12).

II. PROTOCOLES DES ETUDES A MOYEN TERME IN VIVO UTILISEES.

A. BASES DE CES EXPERIMENTATIONS.

1. Initiation.

Un carcinogène génotoxique tel que le FAA induit l'apparition de foyers d'altérations cellulaires et de nodules néoplasiques dans le foie de rat (33, 34).

2. Promotion.

Un carcinogène promoteur tel que le Phénobarbital (45), administré après une phase d'initiation par le FAA, permet le développement des lésions nodulaires néoplasiques (28, 29) qui régressent spontanément quand on stoppe l'administration de l'initiateur.

Les foyers d'altérations cellulaires régressent après l'initiation avec l'administration du promoteur, mais de façon plus lente et significativement différente en comparaison avec la cessation de tout traitement (43, 49).

L'effet carcinogène génotoxique initiateur éventuel des Benzodiazépines sera établi par comparaison avec le FAA, et leur effet éventuellement carcinogène promoteur par comparaison avec le Phénobarbital après une phase d'initiation par le FAA.

Deux expérimentations ont été conduites suivant des protocoles appropriés pour détecter ces deux effets éventuels.

B. ANIMAUX.

1. Caractéristiques.

- Souche et sexe.

Les animaux utilisés étaient des rats Fisher mâles de souche 344. Ils nous ont été fournis par la société CHARLES RIVER FRANCE et ont été soumis à une période d'acclimatation, dans nos locaux, de deux semaines environ avant le début des expérimentations.

Ces animaux ont été choisis en raison de leur utilisation quasi systématique dans tous les essais du même type rapportés par les différents auteurs, qui accordent à cette souche et à ce sexe une plus grande sensibilité de réponse.

- Poids.

Ces rats pesaient environ 150 grammes au début de l'expérimentation génotoxicité et entre 170 et 180 grammes au début de l'expérimentation "promotion".

- Nombre.

180 animaux ont été utilisés pour la première expérimentation, 240 pour la seconde.

Ces animaux ont été répartis par tirage au sort en différents lots, pour les deux expérimentations.

- Identification.

L'identification de chaque animal a été effectuée par un marquage aux oreilles selon la méthode de Sabourdy (1977) modifiée conformément à nos procédures de laboratoire.

2. Entretien.

- Alimentation.

Les animaux ont reçu à volonté de l'aliment composé complet A04C de la société U.A.R. (7, rue Galliéni, Villemoisson, 91360 Epinay-s/Orge, France).

Un contrôle de qualité nutritive, bactériologique et une recherche de polluants éventuels (métaux lourds, mycotoxines, organo-chlorés et organo-phosphorés) ont été effectués sur cet aliment.

En raison du mode d'administration par gavage des Benzodiazépines testées et du Phénobarbital, les animaux des lots témoins et traités avec ces produits ont reçu de l'aliment A04C en granulés.

Le FAA étant incorporé à l'aliment, les animaux qui ont été ainsi traités, ont été alimentés avec de la poudre A04C.

Dans l'expérimentation "promotion" la moitié des animaux témoins a également reçu une alimentation en poudre afin de comparer la consommation alimentaire entre ceux recevant de la poudre et ceux recevant les granulés. Cet essai a échoué. La poudre était administrée dans des ramequins déposés dans les cages individuelles, elle a été plus ou moins renversée ou polluée par les urines et les feces des rats. Néanmoins ce désagrément n'influe pas sur la valeur des expérimentations, l'important étant d'avoir la concentration requise de FAA dans la poudre, ce qui a été vérifié en cours de traitement.

- Abreuvement.

Les animaux ont reçu de l'eau de ville à volonté en biberon individuel de polyéthylène (capacité : 250 ml - embout conique).

- Environnement.

Conditions d'environnement : la température était réglée à 21°C (+ ou - 2°C), l'hygrométrie à 50% (+ ou - 20%), la photopériode à 12/24 heures et l'air était renouvelé 10 fois par heure sans recyclage.

- Habitat.

les animaux étaient entretenus dans des cages individuelles en batteries métalliques SAFI.

C. PRODUITS.

1. Nature de ces produits.

a. N-2-Fluorenylacetamide (2-acetylaminofluorène, FAA)
Formule chimique : N-9H-Fluoren-2-ylacetamide
Propriété pharmacologique : antiparasitaire, déclaré carcinogène par la FDA (Food and Drug Administration)

b. Phénobarbital (Gardénal ND)
Formule chimique : acide phényl-éthyl-5 barbiturique
Propriétés pharmacologiques : hypnotique, sédatif.
Posologie (homme) : 50 à 400 mg/jour

c. Diazépam (Valium ND)
Formule chimique : chloro-7 dihydro-2,3méthyl-1 phényl-5,1 H-benzodiazépine-1,4 one-2
Propriété pharmacologique : tranquillisant
Posologie (homme) : 2 à 20 mg/jour

d. Oxazépam (Séresta ND)
Formule chimique : Chloro-7 hydroxy-3phényl-5 dihydro-1,3 1H-benzodiazépine-1,4 one-2
Propriété pharmacologique : tranquillisant
Posologie (homme) : 1 à 30 mg/jour

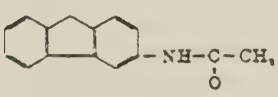
e. Lorazépam (Témesta ND)
Formule chimique : chloro-7(0,chlorophényl)-5dihydro-1,3 hydroxy-3,1 H-benzodiazépine-1,4,one-2
Propriété pharmacologique : tranquillisant
Posologie (homme) : 1 à 10 mg/jour

f. Clorazépate dipotassique (Tranxène ND)
Formule chimique : chloro-7 dihydroxy-2,phényl-5 dihydro-2,4 1H-benzo(f)diazépine-carboxylate-3 de potassium
Propriété pharmacologique : tranquillisant
Posologie (homme) : 15 à 60 mg/jour

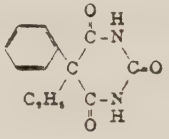
g. CM 6912 (Loflazépate d'éthyle - DCI proposée)
Formule chimique : chloro-7 éthoxycarbonyl-3(fluoro-2 phényl)-5 oxo-2 dihydro-2,3 1H-benzodiazépine-1,4
Propriété pharmacologique : tranquillisant
Posologie (homme) : 6 mg/jour

h. CM 7120 (Carfluzépate d'éthyle _ DCI proposée)
Formule chimique : chloro-7 éthoxycarbonyl-3 (fluoro-2 phenyl)-5 méthylcarbamoyl-1 oxo-2 dihydro-2,3 1H-benzodiazépine-1,4
Propriété pharmacologique : tranquillisant
Posologie (homme) : 6 mg/jour

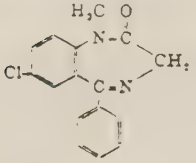
Tableau III : Formules chimiques développées.



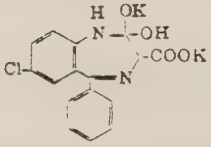
N-2-Fluorenylacetamide



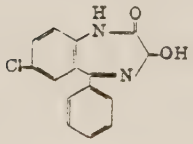
Phénobarbital



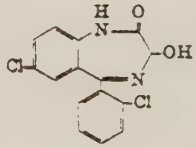
Diazépam



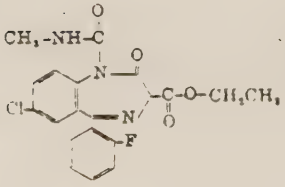
Clorazépate dipotassique



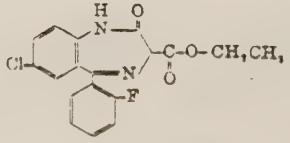
Oxazépam



Lorazépam



CM 6912



CM 7120

2. Contrôles analytiques.

Des contrôles analytiques ont été effectués sur les différents lots de Diazépam, Lorazépam, Oxazépam, Clorazépate dipotassique, CM 6912 et CM 7120. Ces produits se sont révélés conformes.

Le Phénobarbital n'a pas été analysé car il provenait de Gardénal commercialisé par SPECIA, sous forme de comprimés à 0,10 g.

A l'exception du FAA les différents médicaments ont été mis en suspension dans une solution de gomme arabique à 10% pour être ensuite administrés par gavage sous un volume d'administration unique de 5 ml/kg.

3. L'administration a eu lieu sept jours sur sept durant toute la durée des expérimentations.

D. PROTOCOLE DE TRAITEMENT POUR L'EXPERIMENTATION INITIATION.

Tableau IV

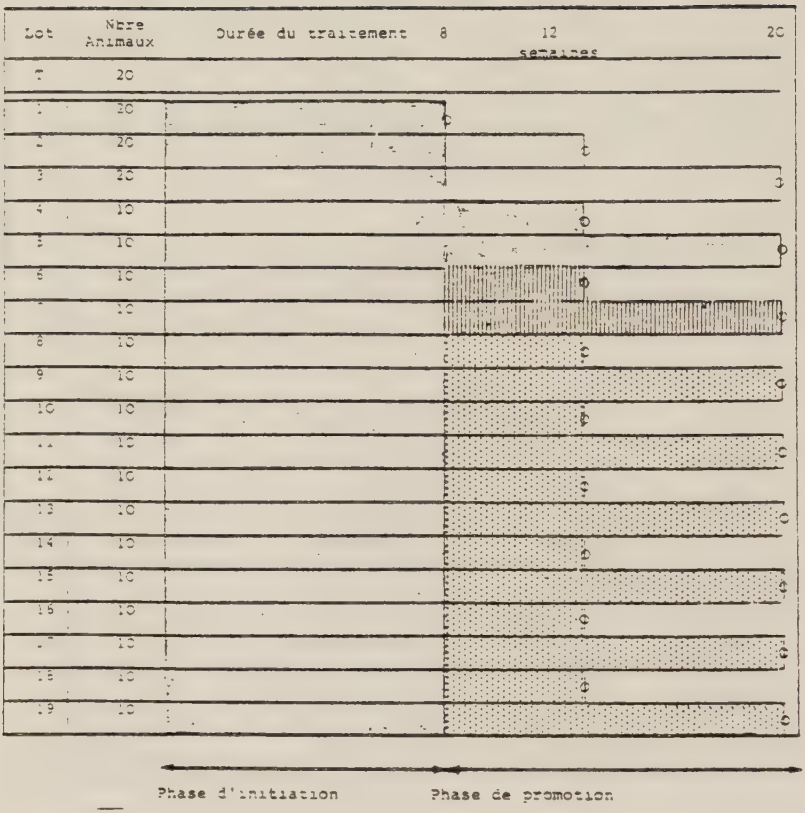
Lot	Nombres d'animaux par lot	Produit	Posologie en mg/kg
Témoin	40	-	-
Lot 1	10	Diazépam	7
Lot 2	10	Diazépam	70
Lot 3	10	Clorazépate	10
Lot 4	10	Clorazépate	100
Lot 5	10	Oxazépam	20
Lot 6	10	Oxazépam	200
Lot 7	10	Lorazépam	3
Lot 8	10	Lorazépam	30
Lot 9	10	CM 6912	3
Lot 10	10	CM 6912	30
Lot 11	10	CM 7120	3
Lot 12	10	CM 7120	30
Lot 13	20	FAA	0,02% dans l'aliment

Durée du traitement 14 semaines
Début de traitement 21.12.79
Fin de traitement 24.03.80

E. PROTOCOLE DE TRAITEMENT POUR L'EXPERIMENTATION PROMOTION.

c.f. tableaux V et VI.

Tableau V



Légende :

- sans traitement
- FAA 0,02%
- Phénobarbital 50 mg/kg
- Benzodiazépines testées
- o Date d'autopsie

POSOLOGIES : Tableau VI

	Lots	Posologie mg/kg
Diazépam	8 et 9	70
Clorazépate	10 et 11	100
Oxazépam	12 et 13	200
Lorazépam	14 et 15	30
CM 6912	16 et 17	30
CM 7120	18 et 19	30

Le traitement a débuté le 9 janvier 1980.

F. Examens pratiqués.

1. Pesée hebdomadaire.

Les animaux ont été pesés toutes les semaines de façon à ajuster hebdomadairement la concentration des produits administrés par gavage dans la solution d'eau gommée à 10%.

2. Sidérose hépatique induite.

Avant autopsie, les animaux ont subi une série de six injections d'Inféron (solution colloïdale de 100 mg de fer/ml) par voie sous-cutanée à raison de 0,125 ml pour 100 grammes de poids vif. Ces injections ont été faites à intervalles de deux jours, la dernière ayant eu lieu la veille de l'autopsie, et ont eu pour but d'induire une sidérose hépatique.

3. Examen anatomopathologique.

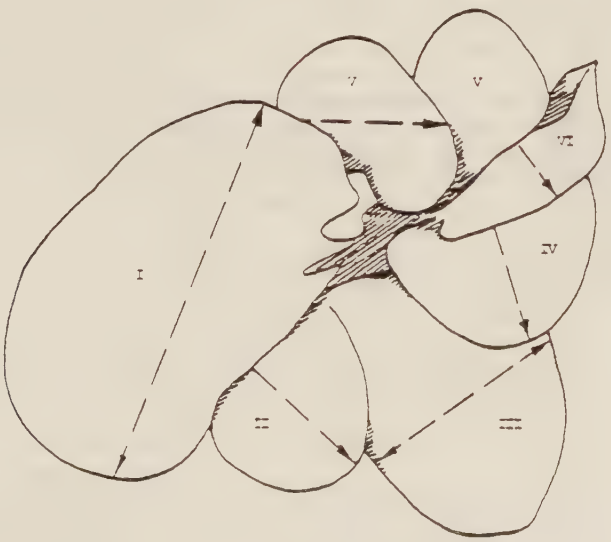
A l'autopsie, après pesée et exanguination de l'animal, le foie a été prélevé puis pesé.

Les différents lobes hépatiques (gauche, médial gauche, médial droit, droit antérieur, droit postérieur et caudé) ont été découpés dans le sens de leur plus grande largeur (Figure I). Les parties distales des lobes ont ensuite été mises à fixer dans une solution tamponnée de formol à 10%.

Après fixation les lobes hépatiques ont été inclus et montés en blocs de paraplast de manière à présenter à la section la face de coupe.

Deux sections sériées de 5 microns d'épaisseur ont été effectuées sur les quatre lobes suivants : gauche, médial gauche, médial droit et droit antérieur. La première a été colorée à l'hématoxyline-éosine, la seconde par la coloration de Perls afin de révéler la sidérose hépatique.

Figure I : foie de rat, face viscérale.



Légende :

I Lobe gauche
II Lobe médial gauche
III Lobe médial droit
IV Lobe droit antérieur
V Lobe droit postérieur
VI Lobe caudé
⟵ ⟶ Coupe

4. Examens biochimiques.

Ils n'ont été pratiqués que pour l'expérimentation "promotion".

a) Biochimie hépatique :

Pour chaque rat lors de l'autopsie environ un gramme de foie a été prélevé sur l'ensemble des lobes puis congelé. Après décongélation chaque échantillon a été dilué au 1/10ème dans une solution à 10% de saccharose 0,25M, homogénéisé à l'aide d'un broyeur de type ultraturax pendant 45 secondes dans de la glace fondante, puis centrifugé. Le surnageant a fait l'objet des différents dosages.

b) Biochimie plasmatique :

A l'autopsie du sang a été prélevé pour chaque animal à l'aorte abdominale, le plasma recueilli a été congelé, et a fait l'objet des mêmes dosages que le broyat hépatique après décongélation.

c) Dosages pratiqués :

Gamma glutamyltranspeptidase	GGT	(39)
Phosphatases alcalines	PAL	(11)
Lactate déshydrogènase	LDH	(51)
Glutamate pyruvique transaminase	GPT	(19)
Glutamate oxaloacetique transaminase	GOT	(19)
Protéines totales		(44)

Ces différents dosages ont été effectués à l'aide d'un analyseur centrifuge.

5. Analyse statistique.

Elle a porté sur les lésions hépatiques et les paramètres biochimiques.

Pour chaque lot, la moyenne et la variation standard ont été déterminées, les tests de signification entre lots ont été effectués à l'aide du test t de Student.

Une étude statistique portant sur l'expérimentation "promotion" a été faite à l'aide d'une analyse en composantes principales (21). Cette méthode a eu pour but de représenter graphiquement sur un plan le nuage de points appartenant à l'espace à quatre dimensions formé par les moyennes des foyers, des nodules, de la GGT hépatique et de la GGT plasmatique des différents lots et aux différents temps (8, 12 et 20 semaines) de l'expérimentation.

RESULTATS

A. Anatomopathologiques.

Du point de vue histologique la mise en évidence de l'activité initiatrice ou promotrice éventuelle des produits testés a été basée sur le comptage des foyers ou zones d'altérations cellulaires et des nodules néoplasiques résistants à la surcharge en fer. Ce comptage a été effectué pour chaque animal et pour les quatre lobes hépatiques principaux.

Avant la présentation des résultats il importe de faire quelques remarques quant aux difficultés de diagnose de ces lésions :

1. Remarques d'ordre général.

a) Critère de base pour le comptage des foyers ou zones :

Le critère adopté a été la présence d'une frontière nette, au point de vue réactivité à la coloration de Perls, entre la lésion Perls négative et le parenchyme voisin Perls positif (ce critère a été adopté sur la recommandation de G. M. Williams en 1980). Car avec l'arrêt du traitement initiateur, les foyers peuvent régresser spontanément, ceci se traduit par un envahissement périphérique progressif de la lésion par la coloration Perls positive. La lésion présente alors à sa périphérie des cellules positives au Perls, et ceci de façon de plus en plus accentuée avec la proximité du tissu sain. Ce phénomène est en relation avec le contrôle que les cellules saines exercent sur les cellules initiées, ce contrôle se faisant par transfert probable de facteurs régulateurs entre cellule normale et cellule initiée. Le parenchyme normal maintenant l'homéostasie générale du tissu : les cellules initiées retrouvent la possibilité de stocker le fer.

Ces phénomènes de régulation auraient lieu par l'intermédiaire des gap junctions (22). Le mode d'action des promoteurs serait de bloquer ces échanges par altération des gap junctions (25), permettant à une cellule initiée de se libérer des facteurs de contrôle émis par les cellules saines voisines et de se développer sur un mode néoplasique (23).

b) Effet cytotoxique du FAA.

Un carcinogène tel que le FAA fait apparaître des cellules néoplasiques, et il a de plus un effet toxique direct sur les cellules saines (5). Ceci se traduit par la présence de nodules de régénération hépatique, qui en plus des caractères morphologiques déjà décrits, ont une réactivité positive au Perls après sidérose induite.

Cet effet cytotoxique provoque donc des phénomènes prolifératifs de compensation. Simultanément il stimule le développement des foyers d'altérations cellulaires et des nodules néoplasiques qui sont indifférents à l'effet cytotoxique du carcinogène (5, 42).

Cet effet cytotoxique stimulateur des phénomènes de prolifération est à rapprocher de l'effet de l'hépatectomie partielle pratiquée sur les foies de rat dans des études similaires (40, 41).

c) Prolifération des cellules ovalaires.

- Sur le plan microscopique.

Cette prolifération divise le foie en pseudolobules et envahit des régions de parenchyme parfois assez larges, surtout dans les lobes gauche et médial gauche, enfermant dans son réseau des cellules ou de petits groupes de cellules hépatiques qui sont souvent

négatives à la coloration de Perls. Ces cellules hépatiques n'ont pas été considérées comme une manifestation néoplasique en raison de leur association avec la prolifération des cellules ovalaires.

Ce phénomène, s'il accompagne le processus de cancérogénèse ne lui est cependant pas spécifique (10) car il se produit aussi dans de nombreuses autres conditions, par exemple lors de ligature partielle d'un lobe hépatique.

- Cinétique de développement (étudiée avec l'expérimentation promotion).

Que ce soit avec le FAA seul ou avec la récupération ou le Phénobarbital après 8 semaines de FAA, elle atteint un maximum de développement à 12 semaines puis elle diminue lentement de 12 à 20 semaines.

Elle se présente comme une réaction associée qui se superpose aux lésions spécifiques néoplasiques, et tend à diminuer après 12 semaines (33).

- Sur le plan macroscopique :

Elle est responsable en grande partie de l'aspect granuleux et plurinodulaire des différents lobes hépatiques, les plus touchés étant les lobes gauche et médial gauche qui présentent aussi une atrophie.

d) Réactivité à la coloration de Perls.

- Résultats généraux :

La coloration de Perls s'est révélée forte dans les lots non traités au FAA pour les deux expérimentations, elle était en outre plus faible en zone périportale.

Dans les lots traités avec le FAA cette coloration a été moins forte avec encore une intensité plus faible dans les zones médiolobulaire et périportale. Cette baisse de réactivité au Perls et donc de la capacité à fixer le fer, a encore ajouté à la difficulté de comptage des foyers, qui de plus apparaissent préférentiellement en zones médiolobulaires et périportales.

- Résultats par lots :

La coloration de Perls n'a pas été homogène avec tous les lots. Le tableau VII indique les résultats obtenus lors de l'expérimentation promotion.

Ces colorations hétérogènes entre produits administrés étaient probablement dûes à un manque de protéine fixant le fer dans les cellules hépatiques. Plusieurs hypothèses sont possibles :

- diminution de synthèse de ces protéines.
- diminution relative de leur taux par augmentation globale du taux des synthèses protéiques.

Ces idées ont été formulées par G. M. Williams qui avait aussi constaté la diminution de cette affinité à la coloration de Perls avec le Phénobarbital.

Tableau VII

Lot	Traitement	Perls	Lot	Traitement	Perls
Témoin		++++	10	FAA-8 + Clor-4	+++(+)
1	FAA-8	++	11	FAA-8 + Clor-12	+++
2	FAA-8 + Réc-4	++(+)	12	FAA-8 + Oxa-4	++
3	FAA-8 + Réc-12	+++	13	FAA-8 + Oxa-12	++
4	FAA-12	+++	14	FAA-8 + Lora-4	++
5	FAA-20	+(+)	15	FAA-8 + Lora-12	++
6	FAA-8 + PhB-4	++	16	FAA-8 + 6912-4	+++
7	FAA-8 + PhB-12	+(+)	17	FAA-8 + 6912-12	+++
8	FAA-8 + Dia-4	+++	18	FAA-8 + 7120-4	++(+)
9	FAA-8 + Dia-12	++(+)	19	FAA-8 + 7120-12	++(+)

Légende :

+	:	réactivité Perls : minime			
++		modérée			
+++		bonne			
++++		très bonne			
-4, -8, -12, -20	:	4, 8, 12, 20 semaines			
FAA	:	N-2-Fluorenylacetamide	Oxa	:	Oxazépam
PhB	:	Phénobarbital	Lora	:	Lorazépam
Rec	:	Récupération	6912	:	CM 6912
Dia	:	Diazépam	7120	:	CM 7120
Clor	:	Clorazépate			

2. Résultats anatomopathologiques de l'expérimentation Initiation.

Les lésions apparues avec l'administration du FAA pendant 14 semaines sont celles décrites en D1 de la première partie.

- Foyers ou zones d'altérations cellulaires.
- Nodules néoplasiques.
- Prolifération biliaire, cholangiofibrose, nodules de régénération et prolifération de cellules ovalaires.

En ce qui concerne les foyers et les nodules, les résultats sont négatifs pour l'ensemble des produits par comparaison au lot FAA. Les quatre Foyers notés chez un animal du lot Oxazépam forte dose ne sont pas significatifs, et imputables à la pathologie spontanée du rat Fisher mâle où de telles lésions apparaissent avec l'âge (3).

Tableau VIII

Lot	Produit	Dose en mg/kg	Total foyers: moyenne par animal	Total nodules: moyenne par animal
Témoin	-	-	-	-
1	Diazépam	7	-	-
2		70	-	-
3	Clorazépate	10	-	-
4		100	-	-
5	Oxazépam	20	-	-
6		200	4 foyers/un animal	-
7	Lorazépam	3	-	-
8		30	-	-
9	CM 6912	3	-	-
10		30	-	-
11	CM 7120	3	-	-
12		30	-	-
13	FAA	0,02%	89,7	1.25

Ces résultats indiquent l'absence d'effet carcinogène initiateur des différents produits testés pour le foie de rat, après un traitement de 14 semaines, aux doses précédemment citées, et dans les conditions expérimentales propres à notre laboratoire.

3. Résultats anatomopathologiques de l'expérimentation Promotion.

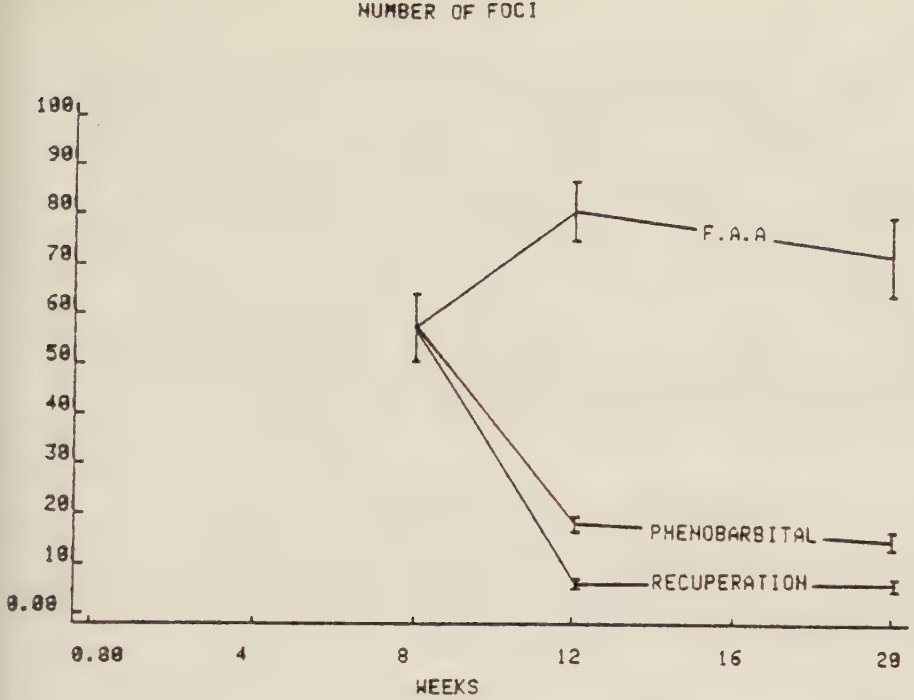
a) Foyers ou zones d'altérations cellulaires :

- Lots témoins positifs (Figure II, Tableau IX) :

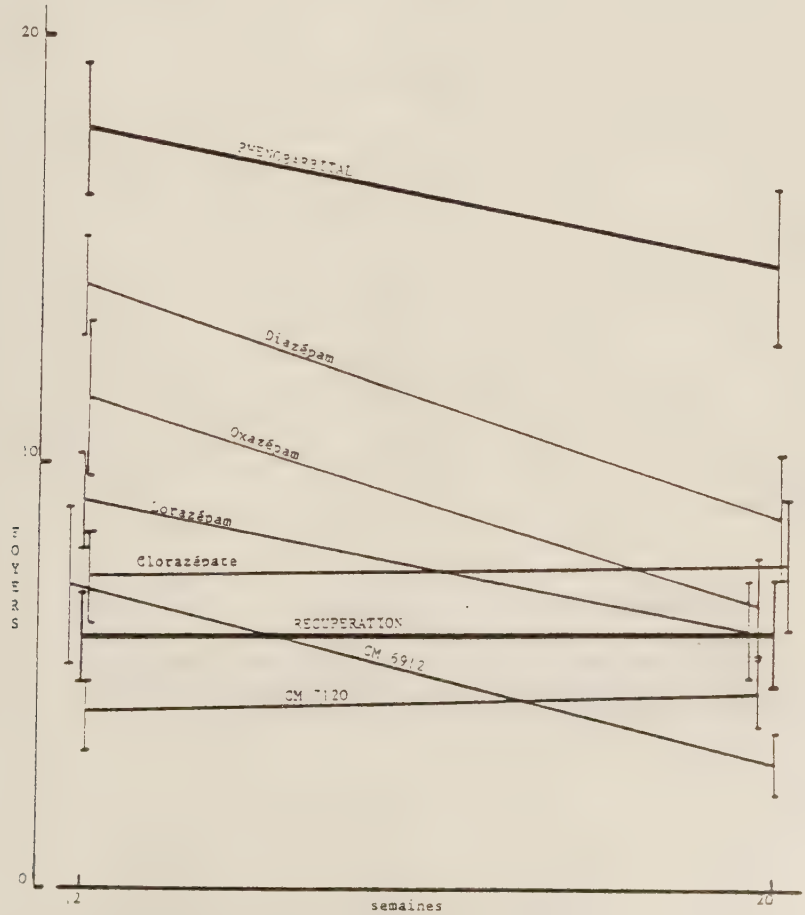
. La poursuite de l'administration du FAA voit leur nombre augmenter de 8 à 12 semaines et atteindre un plateau entre 12 et 20 semaines (peu de différence significative à 12 semaines par rapport à 8 semaines, et pas de différence significative à 20 semaines par rapport à 8).

. L'administration du Phénobarbital ou la récupération voit leur nombre diminuer brutalement entre 8 et 12 semaines et de façon plus lente entre 12 et 20 semaines. (Différences significatives des lots FAA 12 et 20 semaines par rapport aux autres lots après 8 semaines d'initiation par le FAA).

. La régression de ces lésions ne stockant pas le fer est plus rapide avec la récupération qu'avec le Phénobarbital, les deux courbes de régression sont nettement individualisées (différences significatives entre les lots repos et Phénobarbital à 4 semaines et les lots repos et Phénobarbital à 12 semaines, après 8 semaines d'initiation par le FAA). Observation conforme à celle de G. M. Williams et H. Watanabe (49).



gure II : Foyers ou zones, lots témoins positifs.



gure III : Foyers ou zones, Benzodiazépines.

- Etude par produits testés des zones ou foyers d'altérations cellulaires (Figure III, Tableau IX) :

. Le Clorazépate, le CM 6912 et le CM 7120 ont un comportement semblable à la récupération aux temps 4 et 12 semaines à partir de l'arrêt de l'initiation par le FAA.

. L'Oxazépam et le Lorazépam sont intermédiaires entre le Phénobarbital et la récupération à 4 semaines (différences non significatives par rapport aux deux) et sont semblables au repos à 12 semaines.

. Le Diazépam est semblable au Phénobarbital à 4 semaines (différence non significative par rapport au Phénobarbital et significative par rapport à la récupération), mais il est semblable à la récupération à 12 semaines (différence non significative par rapport à la récupération et significative par rapport au Phénobarbital).

Tableau IX

Test de Student : Foyers

Référence / Lot testé	FAA-8 Rec-4	FAA-8 Rec-12	FAA-8 PhB-4	FAA-8 PhB-12	FAA 12	FAA 20
FAA-8	** ↑	** ↑	** ↑	** ↑	* ↓	NS
FAA-8 + Rec-4			** ↓		** ↓	
FAA-8 + Rec-12				** ↓		** ↓
FAA-8 + PhB-4	** ↑				** ↓	
FAA-8 + PhB-12		** ↑				** ↓
FAA-8 + Dia-4	** ↑		NS			
FAA-8 + Dia-12		NS		* ↓		
FAA-8 + Clor-4	NS		** ↓			
FAA-8 + Clor-12		NS		* ↓		
FAA-8 + Oxa-4	* ↑		* ↓			
FAA-8 + Oxa-12		NS		** ↓		
FAA-8 + Lora-4	* ↑		** ↓			
FAA-8 + Lora-12		NS		** ↓		
FAA-8 + 6912-4	NS		** ↓			
FAA-8 + 6912-12		* ↓		** ↓		
FAA-8 + 7120-4	NS		** ↓			
FAA-8 + 7120-12		NS		** ↓		

Légende :

*	Différence significative à $p<0.05$
**	Différence significative à $p<0.01$
↓	Diminution par rapport au lot de référence
↑	Augmentation par rapport au lot de référence
NS	Différence non significative.

- Remarque sur la courbe d'établissement de foyers ou zones d'altérations cellulaires :

Leur cinétique d'apparition semble présenter un plateau après 12 semaines de traitement par le FAA. Les données de cette expérimentation sont partielles et ne débutent qu'à 8 semaines.

Dans les précédentes études rapportées par G. M. Williams et Mirovuki Tsuda, la courbe d'apparition de ces lésions entre 6 et 8 semaines a une allure exponentielle.

Les données de notre expérimentation apportent un élément nouveau : l'apparition de ces lésions semble suivre la loi générale d'apparition des cancers.

b) Nodules néoplasiques.

- Résultats des lots témoins positifs (Figure IV, Tableau X).

. La poursuite du traitement par le FAA voit leur nombre continuer à augmenter de 8 à 12 semaines et de 12 à 20 semaines, mais de façon non significative à 12 et 20 semaines par rapport à 8 semaines.

. L'administration du Phénobarbital (promoteur) voit leur nombre entretenu au niveau atteint après 8 semaines de FAA : différence non significative après 4 semaines ou 12 semaines de PhB par rapport à 8 semaines de FAA, et différences non significatives entre PhB 4 semaines et FAA 12 semaines, et PhB 12 semaines et FAA 20 semaines.

Tableau X

Test de Student : Nodules

Référence / Lot testé	FAA-8 Rec-4	FAA-8 Rec-12	FAA-8 PhB-4	FAA-8 PhB-12	FAA 12	FAA 20
FAA-8	* ↑	** ↑	NS	NS	NS	NS
FAA-8 + Rec-4			NS		* ↓	
FAA-8 + Rec-12				* ↓		** ↓
FAA-8 + PhB-4	NS				NS	
FAA-8 + PhB-12		* ↑				NS
FAA-8 + Dia-4	NS		NS			
FAA-8 + Dia-12		NS		* ↓		
FAA-8 + Clor-4	NS		* ↓			
FAA-8 + Clor-12		NS		NS		
FAA-8 + Oxa-4	NS		NS			
FAA-8 + Oxa-12		NS		* ↓		
FAA-8 + Lora-4	NS		* ↓			
FAA-8 + Lora-12		NS		* ↓		
FAA-8 + 6912-4	NS		NS			
FAA-8 + 6912-12		NS		** ↓		
FAA-8 + 7120-4	** ↓		* ↓			
FAA-8 + 7120-12		NS		** ↓		

Légende : c.f. tableau IX

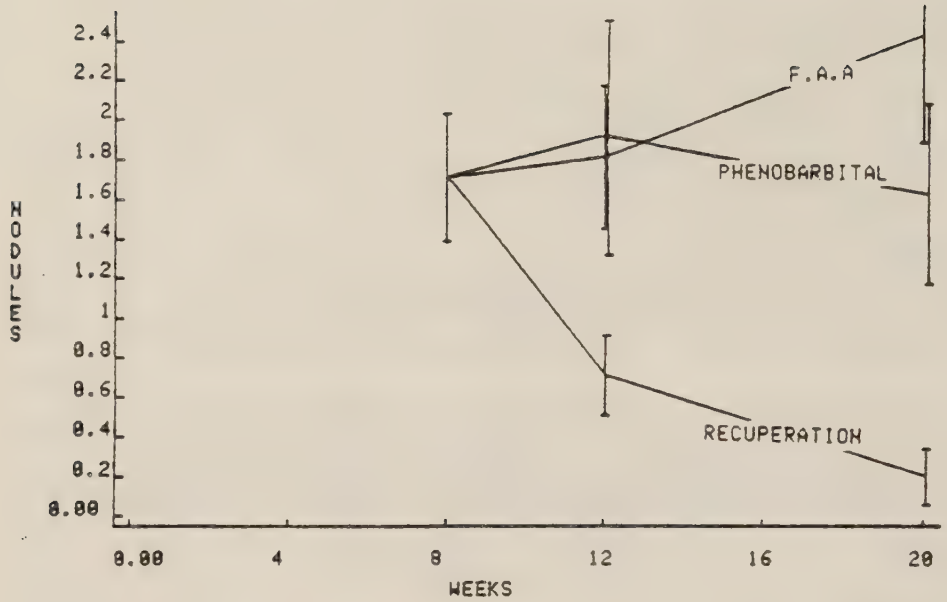


Figure IV : Nodules, lots témoins positifs.

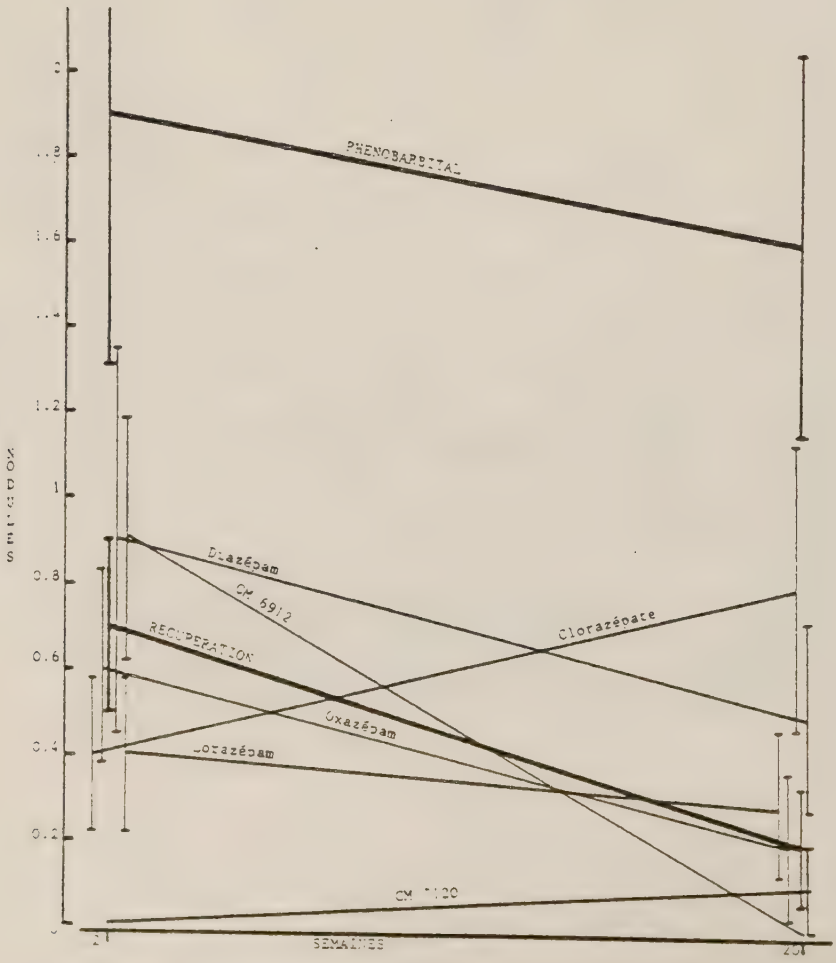


Figure V : Nodules, Benzodiazépines.

. La récupération voit leur nombre diminuer nettement après 8 semaines de FAA pendant les 4 premières semaines puis plus lentement:

A 4 semaines ou 12 semaines : différences significatives par rapport à 8 semaines de FAA.

A 4 semaines de récupération : différence non significative par rapport à 4 semaines de Phénobarbital et différence significative par rapport à 12 semaines de FAA.

A 12 semaines de récupération : différence significative par rapport à 12 semaines de Phénobarbital et 20 semaines de FAA.

- Etude des nodules néoplasiques pour les différents produits testés (Figures V, Tableau X) :

Le Diazépam, l'Oxazépam, le Lorazépam, le CM 6912 et le CM 7120 ont un comportement semblable à la récupération.

Le Clorazépate dipotassique est semblable au repos à 4 semaines, mais devient intermédiaire entre récupération et Phénobarbital à 12 semaines (pas de différences significatives par rapport à ces lots).

4. Discussion sur les résultats anatomopathologiques.

a) Validité de ces résultats :

- expérimentation initiation : les résultats obtenus avec le lot FAA sont conformes aux données de la littérature (33, 34).

- expérimentation promotion : les résultats sont conformes avec ceux obtenus par G. M. Williams et Peraino (28, 29, 43, 49), c'est à dire :

augmentation du nombre des nodules néoplasiques avec la continuation du traitement par le FAA, alors que le nombre des foyers semble atteindre un plateau.

Persistance des nodules néoplasiques avec le promoteur Phénobarbital après initiation par le FAA (premier paramètre de la promotion) et régression de ces nodules avec la récupération après initiation.

Régression des foyers ou zones d'altérations cellulaires, négatifs à la coloration de Perls, après initiation avec le FAA. La régression est rapide avec la récupération et plus lente avec le Phénobarbital, les deux courbes de régression étant significativement distinctes (deuxième paramètre de la promotion).

b) Les Benzodiazépines sont-elles des carcinogènes initiateurs ?

L'expérimentation initiation a répondu non : les résultats sont négatifs dans tous les lots traités aux Benzodiazépines.

De plus l'expérimentation promotion permet de confirmer les résultats obtenus avec la première. En effet des initiateurs carcinogènes se seraient comportés de la même manière que le FAA du point de vue de la cinétique d'apparition des foyers ou zones d'altérations cellulaires. La régression de ces lésions observées dans tous les cas après la phase d'initiation confirme l'absence d'effet initiateur de ces différents produits, et du Phénobarbital en particulier qui est un pur promoteur.

c) Les Benzodiazépines sont-elles des carcinogènes promoteurs ?

Il est d'emblée possible de répondre de façon négative pour le Diazépam, l'Oxazépam, le Lorazépam, le CM 6912 et le CM 7120 qui se comportent de la même manière que la récupération après la phase d'initiation.

Le Clorazépate ne semble pas manifester d'action promotrice malgré le taux de nodules néoplasiques dénombrés à 12 semaines, car il reste malgré tout non significativement différent de celui de la récupération, et les taux des foyers ou zones sont semblables à ceux de la récupération à 4 et 12 semaines.

5. Résultats anatomopathologiques de l'expérimentation Promotion par lots :

Tableau XI

	TOTAL FOYERS	TOTAL NODULES		TOTAL FOYERS	TOTAL NODULES
LOT TEMOIN			LOT 10		
MOYENNE	0	0	MOYENNE	7.3	.4
S/RAC(N)	0	0	S/RAC(N)	1.08	.18
LOT 1			LOT 11		
MOYENNE	57 4	1 7	MOYENNE	7.7	.8
S/RAC(N)	6.71	.32	S/RAC(N)	1.58	.33
LOT 2			LOT 12		
MOYENNE	5.9	7	MOYENNE	11.5	.6
S/RAC(N)	1 02	2	S/RAC(N)	1.8	.22
LOT 3			LOT 13		
MOYENNE	6.1	2	MOYENNE	6.7	.2
S/RAC(N)	1.29	14	S/RAC(N)	1.15	.17
LOT 4			LOT 14		
MOYENNE	81 1	1.8	MOYENNE	9.1	.4
S/RAC(N)	5 95	.36	S/RAC(N)	1.11	.18
LOT 5			LOT 15		
MOYENNE	72	2.4	MOYENNE	6.1	.3
S/RAC(N)	7.94	.54	S/RAC(N)	1.38	.17
LOT 6			LOT 16		
MOYENNE	17 8	1 9	MOYENNE	7.1	9
S/RAC(N)	1.54	.59	S/RAC(N)	1.8	.28
LOT 7	•		LOT 17		
MOYENNE	14.7	1 6	MOYENNE	3	0
S/RAC(N)	1.85	.45	S/RAC(N)	.7	0
LOT 8			LOT 18		
MOYENNE	14 1	9	MOYENNE	4.1	0
S/RAC(N)	1.15	.45	S/RAC(N)	.86	0
LOT 9			LOT 19		
MOYENNE	8 8	5	MOYENNE	4.7	.1
S/RAC(N)	1 46	22	S/RAC(N)	.8	1

3. RESULTATS BIOCHIMIQUES (Expérimentation promotion).

De tous les paramètres étudiés hépatiques et plasmatiques celui qui a manifesté les variations les plus prononcées est la GGT, viennent ensuite les phosphatases alcalines et la glutamate pyruvique transaminase à un moindre degré. Les taux des autres enzymes et des protéines totales n'ont pas été notablement perturbés.

1. Gamma Glutamyl transpeptidase.

a) Résultats des lots témoins positifs :
Elle a très fortement augmenté dans le foie et le plasma avec l'administration du FAA (Figures VI et VIII). Le tableau XII ci-joint indique les facteurs de multiplication du taux de base (obtenu avec le lot témoin), aux différents temps de traitement par le FAA.

Tableau XII : Facteurs de multiplication de la GGT

Traitement	Foie	Plasma
FAA-8	x 27,8	x 5
FAA-12	x 56,1	x 27
FAA-20	x 76,7	x 50
FAA-8 + Rec-4	x 9,2	x 2
FAA-8 + Rec-12	x 13,1	x 3
FAA-8 + PhB-4	x 26,6	x 8
FAA-8 + PhB-12	x 40,5	x 10

Avec la récupération après initiation par le FAA, le taux de GGT hépatique et plasmatique régresse mais de façon partielle après 4 semaines pour rester stationnaire dans le plasma entre 4 et 12 semaines et pour augmenter légèrement entre 4 et 12 semaines dans le foie (Figures VI et VIII).
Avec le Phénobarbital les taux des GGT hépatiques et plasmatiques se situent en position intermédiaire entre les taux atteints avec le FAA et ceux atteints avec la récupération à 12 et 20 semaines après le début de l'expérimentation (Figures VI et VIII), avec à chaque fois des différences statistiquement significatives entre ces différents lots (Tableaux XIII et XIV).

b) Résultats des Benzodiazépines testées :
Elles ont toutes la même action que la récupération à 12 semaines sur les taux sanguins et plasmatiques de GGT (Figures VII et IX, et tableaux XIII et XIV).
Après quatre semaines d'administration la récupération est partielle pour toutes ces Benzodiazépines en considérant le taux plasmatique ou le taux hépatique.

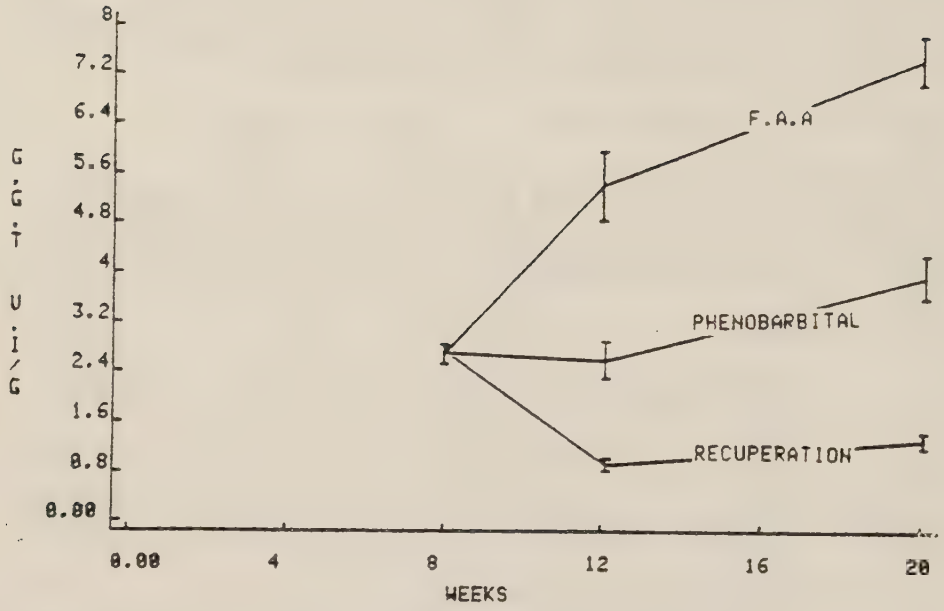


Figure VI : GGT hépatique, lots témoins positifs.

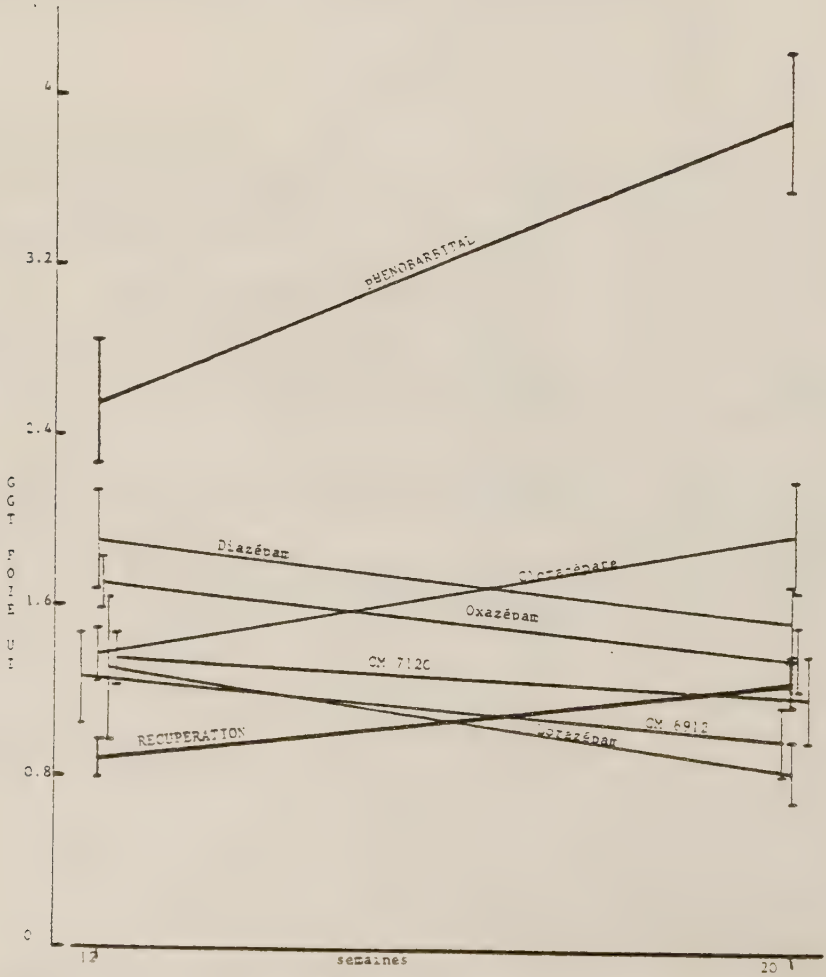
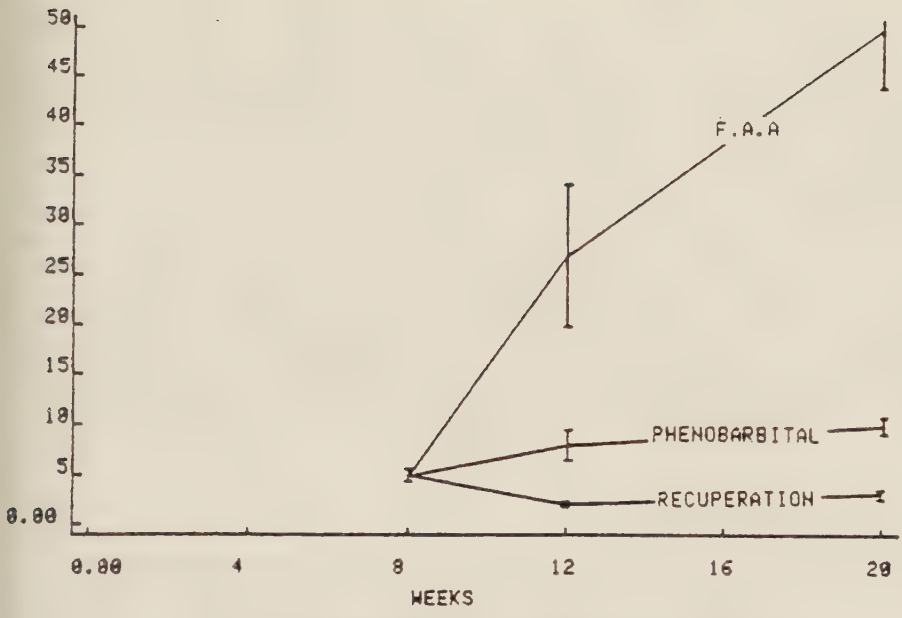
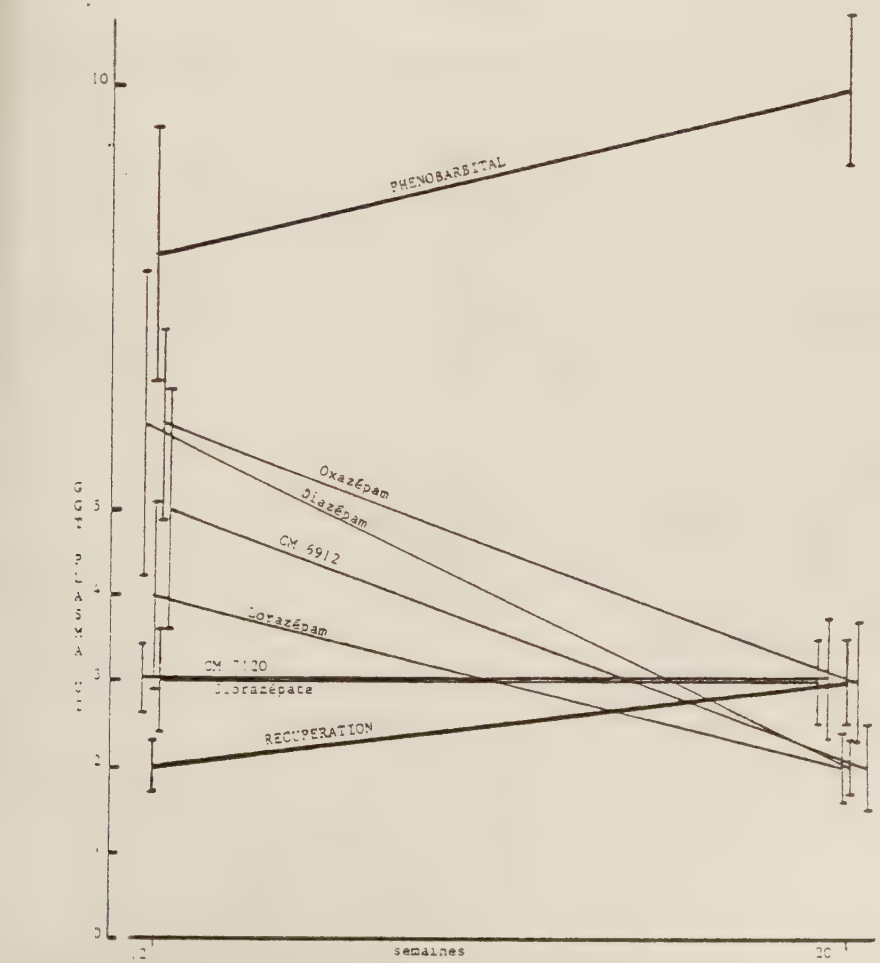


Figure VII : GGT hépatique, Benzodiazépines.



ure VIII : GGT plasmatique, lots témoins positifs.



re IX : GGT plasmatique, Benzodiazépines.

c) Analyse de ces résultats :

La GGT apparaît indiscutablement comme un excellent marqueur du phénomène d'initiation en raison de l'accroissement très marqué de son taux hépatique et plasmatique, à partir d'un niveau de base très bas, ce qui correspond au phénomène de dédifférenciation des hépatocytes en évolution néoplasique. La GGT traduit aussi nettement l'évolution du phénomène de carcinogénèse quand on continue l'administration du carcinogène génotoxique.

Cette enzyme est de plus un bon indicateur d'un phénomène d'initiation antérieur (abaissement partiel des taux sanguin et plasmatique avec la récupération).

En ce qui concerne le phénomène de promotion, l'analyse s'avère délicate car le Phénobarbital est aussi inducteur enzymatique, il aurait fallu disposer de lots témoins traités au Phénobarbital uniquement pour pouvoir faire la part de ce phénomène.

Quoiqu'il en soit la plupart des Benzodiazépines testées et en particulier le Diazépam, sont aussi des inducteurs enzymatiques. Ce qui permet, de manière toute relative, de reconnaitre grâce à la GGT hépatique ou plasmatique l'effet promoteur du Phénobarbital.

Tableau XIII

Test de Student : GGT hépatique

	FAA-8 Rec-4	FAA-8 Rec-12	FAA-8 PhB-4	FAA-8 PhB-12	FAA 12	FAA 20
FAA-8	**↑	**↑	NS	**↓	**↓	**↓
FAA-8 + Rec-4			**↓		**↓	
FAA-8 + Rec-12	*↑			**↓		**↓
FAA-8 + PhB-4	**↑				**↓	
FAA-8 + PhB-12		**↑	**↑			**↓
FAA-8 + Dia-4	**↑		NS			
FAA-8 + Dia-12		NS		**↓		
FAA-8 + Clor-4	**↑		**↓			
FAA-8 + Clor-12		*↑		**↓		
FAA-8 + Oxa-4	**↑		*↓			
FAA-8 + Oxa-12		NS		**↓		
FAA-8 + Lora-4	NS		*↓			
FAA-8 + Lora-12		*↓		**↓		
FAA-8 + 6912-4	NS		**↓			
FAA-8 + 6912-12		NS		**↓		
FAA-8 + 7120-4	**↑		**↓			
FAA-8 + 7120-12		NS		**↓		

Légende : c.f. tableau IX

Tableau XIV

Test de Student : GGT plasmatique

Lot testé \ Référence	FAA-8 Rec-4	FAA-8 Rec-12	FAA-8 PhB-4	FAA-8 PhB-12	FAA 12	FAA 20
FAA-8	** ↑	* ↑	NS	** ↓	* ↓	** ↓
FAA-8 + Rec-4			** ↓		** ↓	
FAA-8 + Rec-12	NS			** ↓		** ↓
FAA-8 + PhB-4	** ↑				** ↓	
FAA-8 + PhB-12		** ↑	NS			** ↓
FAA-8 + Dia-4	NS		NS			
FAA-8 + Dia-12		NS		** ↓		
FAA-8 + Clor-4	NS		* ↓			
FAA-8 + Clor-12		NS		** ↓		
FAA-8 + Oxa-4	* ↑		NS			
FAA-8 + Oxa-12		NS		** ↓		
FAA-8 + Lora-4	NS		NS			
FAA-8 + Lora-12		NS		** ↓		
FAA-8 + 6912-4	NS		NS			
FAA-8 + 6912-12		NS		** ↓		
FAA-8 + 7120-4	NS		** ↓			
FAA-8 + 7120-12		NS		** ↓		

Légende : c.f. tableau IX

2. Phosphatases alcalines (PAL), Protéines Totales (PT), Glutamate pyruvique transaminase (GPT), Glutamate oxaloacétique transaminase (GOT) et Lactacte deshydrogénase (LDH).

a) Résultats des lots témoins positifs :

Le tableau XV indique les facteurs de multiplication de ces différents paramètres, par rapport aux taux de base hépatiques et plasmatiques, pour les différents lots témoins positifs.

Tableau XV.

	FOIE					PLASMA				
	PAL	PT	GPT	GOT	LDH	PAL	PT	GPT	GOT	LDH
FAA-8	2,4	1,2	0,6	1,3	1,1	1,3	0,9	0,3	0,5	0,8
FAA-12	3,3	1,2	0,4	0,7	0,6	1,6	1,9	0,4	0,5	0,5
FAA-20	2,6	1,1	0,6	0,8	0,8	1,3	1	0,6	0,7	0,9
FAA-8 Rec-4	2,3	1,1	0,8	1,2	0,9	1,3	0,9	0,3	0,5	0,6
FAA-8 Rec-12	1,6	1,1	0,9	1	0,9	1	0,9	0,4	0,4	0,5
FAA-8 PhB-4	1,8	1,2	0,8	1,1	1	1	1	0,3	0,4	0,8
FAA-8 PhB-12	1,5	1,3	1	1,2	1	0,8	1	0,4	0,5	1,9

- Phosphatases alcalines :

Le traitement par le FAA s'est manifesté par une augmentation des PAL hépatiques, et plasmatiques dans une moindre proportion. La récupération ou le Phénobarbital après initiation ont vu ce taux baisser partiellement au niveau hépatique et totalement au niveau plasmatique, sans qu'il soit possible de différencier la récupération de la promotion.

Il apparaît ainsi que les PAL hépatiques et plasmatiques peuvent indiquer le phénomène d'initiation. Le retour partiel vers la normale avec les PAL hépatiques peut indiquer un phénomène d'initiation néoplasique antérieur.

- Protéines totales :

Leurs taux hépatiques et plasmatiques n'ont pas été sensiblement modifiés par les différents traitements. Le FAA semble avoir provoqué une très légère augmentation du taux des PT hépatiques, celles ci continuent à augmenter avec le Phénobarbital après initiation, sans que ce phénomène puisse être relié avec celui de la promotion.

- Glutamate pyruvique transaminase (ou Alanine amino transférase)

Ses taux hépatiques et plasmatiques ont été diminués par le traitement initiateur, la récupération ou le Phénobarbital après initiation se sont traduites par un retour au taux de base pour la GPT hépatique, et par une stagnation au niveau atteint après 8 semaines de FAA pour le taux plasmatique. La GPT hépatique semble donc être aussi un marqueur du phénomène d'initiation, elle ne permet pas de différencier la promotion de la récupération, et ne permet pas de déceler un phénomène d'initiation antérieur.

- Glutamate oxaloacetique transaminase (ou Aspartate amino transférase) et lactate deshydrogénase:

Elles ont été augmentées dans le foie après 8 semaines de FAA, puis ont diminué de 8 à 12 semaines pour se situer sous le niveau de base, et enfin elles ont tendu à rejoindre ce niveau de base de 12 à 20 semaines. Ces courbes sigmoïdes montrent que ces enzymes ne peuvent pas apporter de renseignement sur le phénomène d'initiation, et par conséquent ne peuvent pas indiquer la promotion après initiation.

Les taux sanguins de ces enzymes sont d'abord diminués par le traitement initiateur, puis tendent ensuite à revenir à la normale. La récupération après initiation voit une stagnation des taux de la GOT et de la LDH plasmatiques au niveau atteint après 8 semaines d'initiation, le Phénobarbital provoque une stagnation de la GOT plasmatique, et un retour à la normale suivi d'un dépassement de ce taux de base pour la LDH plasmatique.

b) Résultats des Benzodiazépines testées (Tableaux XVI et XVII):

Elles se comportent comme le Phénobarbital ou la récupération pour ces différents paramètres.

c) Analyse de ces résultats :

Les phénomènes de promotion et de récupération ne peuvent être différenciés par les PAL, les protéines totales, la GPT, la GOT ou la LDH.

Seul le phénomème d'initiation peut être indiqué par les PAL et la GPT hépatiques et plasmatiques, de même qu'un phénomène d'initiation antérieur peut être indiqué par les PAL hépatiques.

3. Discussion :

La GGT hépatique et plasmatique apparaît comme un très bon marqueur du phénomène d'initiation, et d'un phénomène d'initiation antérieur.

promotion et la récupération après initiation sont difficilement
parables dans l'expérimentation promotion telle qu'elle a été
nduite, car il est difficile d'apprécier la part qui revient à
effet inducteur enzymatique du Phénobarbital.
Les PAL et la GPT hépatiques et plasmatiques semblent être
ssi, à un degré beaucoup plus faible, des marqueurs du phénomène
initiation.

4. Résultats biochimiques par lots : c.f. Tableaux XVI et XVII.

bleau XVI

Résultats biochimiques des homogénats foie en unité par kg

HOMOGENATS ÉPREUVES BIOCHIMIQUES Ebullition du Pichia JOUR	PROTEINES G/L	G P T U I	G O T U I	P. ACID. U I	L D H U I	G O T U I
LOT 0 TEMOIN MALE						
MOYENNE	1.20	46700	34307	1042	202311	92.
D/MOY(%)	2.3	1667.2	1523.7	49.3	4400.5	11.1
LOT 1 MALE						
MOYENNE	1.47	27750	68030	2530	225870	2674
D/MOY(%)	2.3	962.1	2188	87.8	4245.1	157.5
LOT 2 MALE						
MOYENNE	1.30	36500	64734	2461	188622	887
D/MOY(%)	2.3	2307.2	3147.2	143.6	7671.5	93
LOT 3 MALE						
MOYENNE	1.40	40700	35740	1734	189100	1263
D/MOY(%)	2.2	1642.8	2613.9	63.3	5217.3	119.5
LOT 4 MALE						
MOYENNE	1.46	17867	38736	3443	128867	5303
D/MOY(%)	3.8	1767.6	4038.8	260.7	11214.4	557.1
LOT 5 MALE						
MOYENNE	1.34	29250	43640	2704	163020	7364
D/MOY(%)	3.7	1653.9	2391.5	110.8	8827	371.1
LOT 6 MALE						
MOYENNE	1.30	39700	39600	1869	197100	2940
D/MOY(%)	4.2	2243.6	3940.1	132.6	9300.4	294.4
LOT 7 MALE						
MOYENNE	1.40	50350	44973	1370	213300	3690
D/MOY(%)	3.3	2500.6	4124.2	128.3	4049	339.5
LOT 8 MALE						
MOYENNE	1.34	31311	48944	2351	213733	1700
D/MOY(%)	2.9	3064.9	4930.3	227.7	2291.8	249.6
LOT 9 MALE						
MOYENNE	1.42	34940	44160	1766	190900	1233
D/MOY(%)	2.9	4365.3	2393.7	90.9	10490.7	176.

HOMOGENATS ÉPREUVES BIOCHIMIQUES Ebullition du Pichia JOUR	PROTEINES G/L	G P T U I	G O T U I	P. ACID. U I	L D H U I
LOT 10 MALE					
MOYENNE	1.47	31697	73114	2411	207193
D/MOY(%)	1.8	3755.8	3694	251.1	12766.8
LOT 11 MALE					
MOYENNE	1.43	50867	44978	2002	208178
D/MOY(%)	4.4	4107.2	5946.3	123.4	9693.2
LOT 12 MALE					
MOYENNE	1.29	37425	53500	2440	196345
D/MOY(%)	3	3057.1	5124.8	139.1	10155.4
LOT 13 MALE					
MOYENNE	1.43	27133	31600	2038	180000
D/MOY(%)	5.6	4501.2	5332.9	87.6	14770.5
LOT 14 MALE					
MOYENNE	1.27	41475	61400	1655	208400
D/MOY(%)	2.3	2958.5	4430	194.8	10341.3
LOT 15 MALE					
MOYENNE	1.29	47600	34100	1443	209700
D/MOY(%)	4.4	2417.2	3228	88.2	9240.4
LOT 16 MALE					
MOYENNE	1.33	35373	50323	1826	182930
D/MOY(%)	4.2	1609.5	2412.2	149.7	7476.2
LOT 17 MALE					
MOYENNE	1.41	37829	55200	1700	201771
D/MOY(%)	3.4	4012.8	3639.1	104	4912.8
LOT 18 MALE					
MOYENNE	1.37	32493	38849	1733	176370
D/MOY(%)	2	1137.7	2482.2	105.4	4916.9
LOT 19 MALE					
MOYENNE	1.43	42711	36400	1443	194267
D/MOY(%)	3.2	2622.4	3714.1	121.7	8337.7

HOMOGENATS ÉPREUVES BIOCHIMIQUES Ebullition du Pichia JOUR	G O T U I	G P T U I
LOT 10 MALE		
MOYENNE	1377	1947
D/MOY(%)	129.5	244.8
LOT 11 MALE		
MOYENNE	1704	1704
D/MOY(%)	123	123
LOT 12 MALE		
MOYENNE	1377	1377
D/MOY(%)	148.4	148.4
LOT 13 MALE		
MOYENNE	1276	1276
D/MOY(%)	325.9	325.9
LOT 14 MALE		
MOYENNE	833	833
D/MOY(%)	148.1	148.1
LOT 15 MALE		
MOYENNE	1264	1264
D/MOY(%)	211.4	211.4
LOT 16 MALE		
MOYENNE	997	997
D/MOY(%)	158	158
LOT 17 MALE		
MOYENNE	1334	1334
D/MOY(%)	121	121
LOT 18 MALE		
MOYENNE	1182	1182
D/MOY(%)	209.7	209.7

Résultats biochimiques plasmatiques en unité par litre

EXAMENS SANGUINS BIOCHIMIQUES
EDITION DU FICHIER JOUR

	PROTEINES G/L	G P T U I	G O T U I	P. ALCAL U I	L D H U I	G GT U I
LOT 0 TEMOIN MALE						
MOYENNE	64	101	98	242	349	1
S/RAC(N)	1 4	14 2	11 2	12	41 2	1
LOT 1 MALE						
MOYENNE	61	27	53	321	405	5
S/RAC(N)	7	2	4 2	15 6	62 8	6
LOT 2 MALE						
MOYENNE	58	34	45	326	309	2
S/RAC(N)	1 5	2 1	2 6	12 1	41 6	3
LOT 3 MALE						
MOYENNE	61	40	43	245	287	3
S/RAC(N)	1 1	2 7	2	7 6	25 5	5
LOT 4 MALE						
MOYENNE	57	41	49	388	278	27
S/RAC(N)	2 4	3	3 5	32 1	35 4	7 1
LOT 5 MALE						
MOYENNE	63	65	70	327	508	30
S/RAC(N)	9	9 8	8	22	87 7	6 1
LOT 6 MALE						
MOYENNE	64	36	42	242	454	8
S/RAC(N)	1 7	1 9	1 4	11 3	51 3	1 5
LOT 7 MALE						
MOYENNE	67	39	53	208	1042	10
S/RAC(N)	1 2	3 3	3 3	8 4	61	9
LOT 8 MALE						
MOYENNE	50	26	28	228	256	6
S/RAC(N)	3 8	3 1	2 4	20 7	25 8	1 8
LOT 9 MALE						
MOYENNE	51	23	33	132	762	2
S/RAC(N)	1 3	1 5	2 2	9 5	98 5	3

EXAMENS SANGUINS BIOCHIMIQUES
EDITION DU FICHIER JOUR

	PROTEINES G/L	G P T U I	G O T U I	P. ALCAL U I	L D H U I	G GT U I
LOT 10 MALE						
MOYENNE	52	24	32	235	266	3
S/RAC(N)	3 5	2 3	3 3	23 3	63 3	6
LOT 11 MALE						
MOYENNE	52	28	28	180	344	3
S/RAC(N)	1 4	1 8	2 6	11	60 5	5
LOT 12 MALE						
MOYENNE	51	28	30	303	260	6
S/RAC(N)	3 5	2 9	2 4	26 1	35 2	1 1
LOT 13 MALE						
MOYENNE	55	34	38	199	385	3
S/RAC(N)	1 1	4 3	4 1	13 3	36	7
LOT 14 MALE						
MOYENNE	64	38	44	412	187	4
S/RAC(N)	3 3	2 1	4 3	22 7	68 7	1 1
LOT 15 MALE						
MOYENNE	64	43	47	237	413	2
S/RAC(N)	1 4	2 7	4 2	9 6	31 1	4
LOT 16 MALE						
MOYENNE	60	32	39	309	218	5
S/RAC(N)	3 2	3	3 3	27 2	40 9	1 4
LOT 17 MALE						
MOYENNE	59	32	38	221	263	2
S/RAC(N)	2	2 4	2 4	15 7	27 2	5
LOT 18 MALE						
MOYENNE	44	21	27	216	103	3
S/RAC(N)	2 3	1 6	2	7 6	28 4	4
LOT 19 MALE						
MOYENNE	60	33	38	199	135	3
S/RAC(N)	8	1 9	2 2	6 2	11 1	7

CORRELATIONS ENTRE LES RESULTATS ANATOMOPATHOLOGIQUES ET LES
LTATS BIOCHIMIQUES.

ORRELATIONS OBTENUES A PARTIR DES VALEURS INDIVIDUELLES.

Le tableau XVIII indique les valeurs de ces corrélations
eurs des animaux témoins exceptées) pour les quatre paramètres
ants :
- Foyers ou zones d'altérations cellulaires
- Nodules néoplasiques
- GGT hépatique
- GGT plasmatique

eau XVIII

	GGT hépatique	GGT plasmatique	Foyers	Nodules
GGT hépatique	1			
GGT plasmatique	0,871	1		
Foyers	0,698	0,621	1	
Nodules	0,522	0,430	0,475	1

La probabilité pour que chacun des coefficients de corrélation
re deux paramètres s'écarte des valeurs du tableau est inférieure
01% (valeur donnée par la table de corrélations, réf. 36, pour
ddl de 100, ici la ddl est de 220-2).
Ceci indique la forte corrélation qu'il existe entre les divers
mètres pris deux à deux.
Les GGT hépatique et plasmatique sont très bien corrélées entre
s, et chacune d'elles est bien corrélée avec le taux de foyers ou
s, et un peu moins bien avec celui de nodules.
Le dosage des GGT permettrait donc d'établir une première
oximation du taux de foyers ou nodules, et donc du stade
olution des divers traitements carcinogènes avant l'obtention des
nées anatomopathologiques.
De plus des dosages sanguins de la GGT avant le sacrifice
ettraient de suivre l'évolution des phénomèmes de carcinogénèse.
Toutefois les déductions que l'on pourrait tirer de ces données
euvent se substituer aux paramètres anatomopathologiques,
tables témoins des phénomèmes de carcinogénèse.

NALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES.

Représentations graphiques et analyses :

- but : le but de cette analyse a été de trouver une
ésentation graphique synthétique de l'expérimentation promotion.
a été basée sur les valeurs moyennes obtenues dans chacun des
, lot témoin excepté, pour les quatre paramètres suivants :
  - GGT hépatique
  - GGT plasmatique
  - Foyers ou zones d'altérations cellulaires
  - Nodules néoplasiques

La représentation graphique de l'ensemble de ces 76 chiffres visait à montrer l'évolution des différents traitements dans le temps, à comparer ces traitements entre eux et à différencier le rôle de chacun des quatre paramètres.

La méthode utilisée consiste à projeter sur un plan le nuage de points appartenant à l'espace à quatre dimensions dont chaque dimension correspond à un paramètre. Les deux axes du plan sont définis comme des combinaisons linéaires des quatre paramètres, et constituent les axes principaux d'inertie du nuage de points.

Les quatre valeurs correspondant au lot FAA 8 semaines ont été affectées d'un poids 10 dans l'analyse en composantes principales, puisqu'elles représentaient en fait le niveau commun au temps t1 des différents traitements.

- Résultats :

Les pourcentages d'inertie (variance expliquée) correspondant à chacun des deux axes principaux du plan de projection de l'ensemble des points appartenant à l'espace à quatre dimensions sont donnés dans le tableau XIX.

Tableau XIX.

	Pourcentage d'inertie	Pourcentage cumulé
axe a1	79	79
axe a2	17	96

Ceci montre que la représentation plane ainsi définie représente 96% de la variance expliquée, c'est à dire 96% de l'information contenue dans le nuage de points. La figure X représente la position des différents traitements et des quatre paramètres sur le plan a1 a2. Chaque traitement y est représenté par trois points (aux temps t1, t2, t3), en reliant ces trois points on matérialise le comportement de ce traitement dans le temps.

- Analyse : la figure X montre une différenciation nette des traitements initiateur (FAA), promoteur (PB) et récupérateur (Rec) aux temps 2 et 3 à partir du point commun représentant 8 semaines de traitement par le FAA.

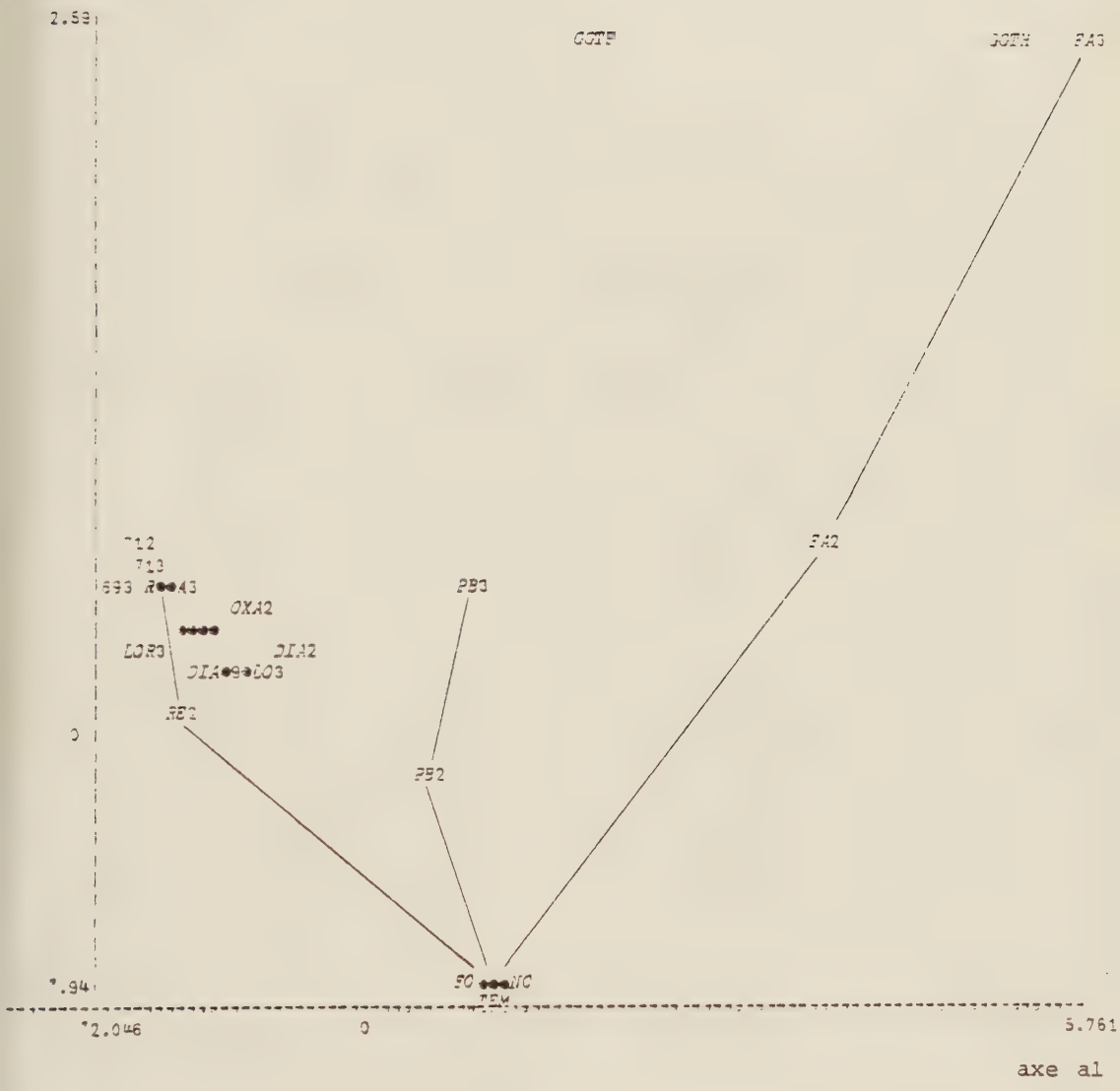
Les autres traitements (Diazépam, Clorazépate, Oxazépam, Lorazépam, CM 6912 et CM 7120) sont regroupés autour de la récupération.

L'axe a1 (79% d'inertie) peut être interprété comme étant un indicateur de l'intensité des altérations cellulaires allant de la récupération à l'initiation en passant par la promotion.

Légende de la figure X :

GGT hépatique	: GGTH	FAA 8 sem DIA-12	sem :	DIA 3
GGT plasmatique	: GGTP	FAA 8 sem CLOR-4	sem :	CLO 2
Foyers ou zones	: FO	FAA 8 sem CLOR-12	sem :	CLO 3
Nodules	: NO	FAA 8 sem OXAZ-4	sem :	OXA 2
FAA 8 sem	: TEM	FAA 8 sem OXAZ-12	sem :	OXA 3
FAA 8 sem Rec 4 sem	: Rec 2	FAA 8 sem LORAZ-4	sem :	LOR 2
FAA 8 sem Rec 12 sem	: Rec 3	FAA 8 sem Loraz-12	sem :	LOR 3
FAA 8 sem PhB 4 sem	: PB 2	FAA 8 sem 6912-4	sem :	69 2
FAA 8 sem PhB 12 sem	: PB 3	FAA 8 sem 6912-12	sem :	69 3
FAA 8 sem DIA -4 sem	: DIA 2	FAA 8 sem 7120-4	sem :	71 2
		FAA 8 sem 7120-12	sem :	71 3

Figure X

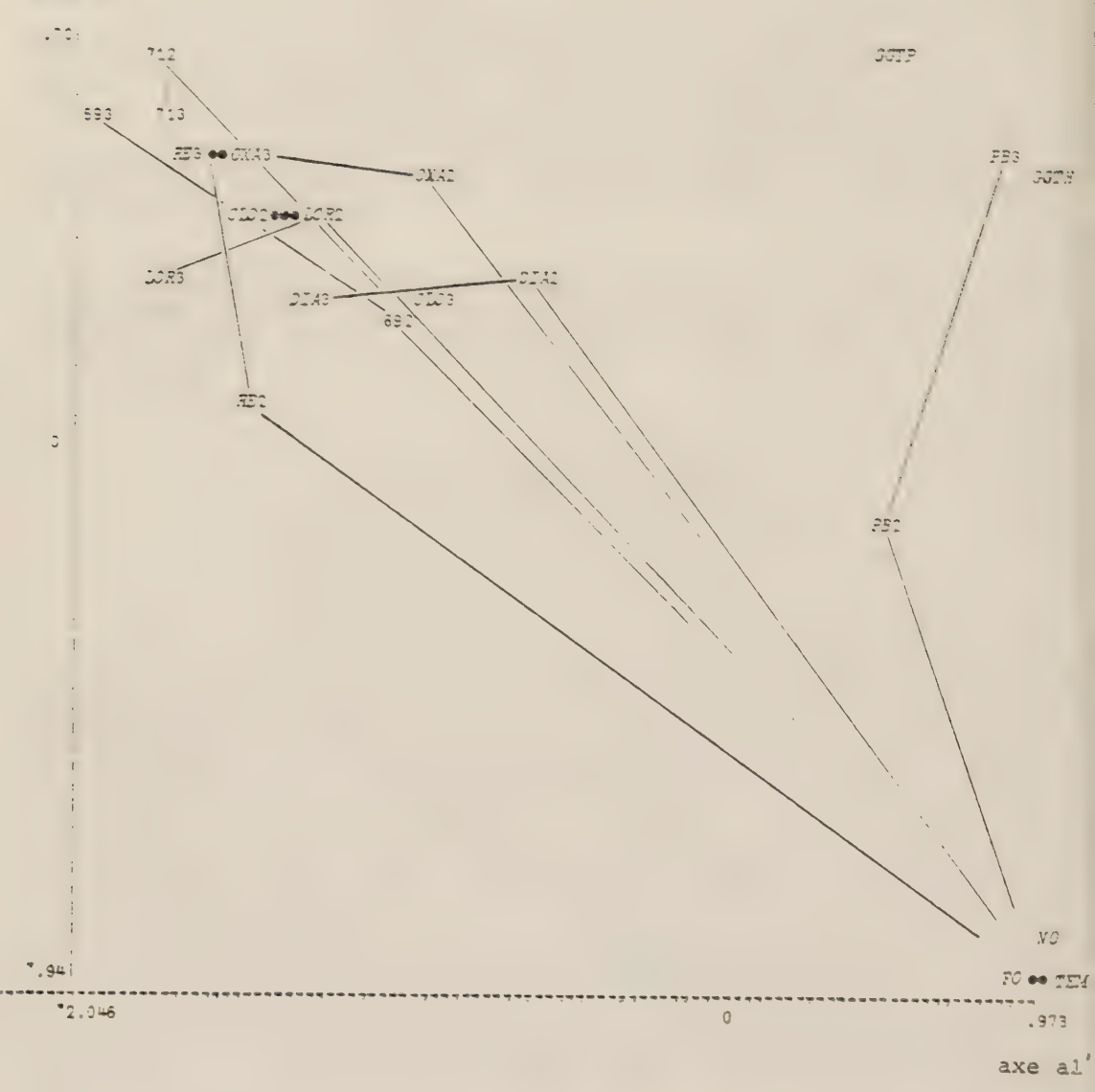


- La figure XI est le résultat de la même analyse en composantes principales après élimination du traitement par le FAA aux temps 2 et 3. Dans les deux nouveaux axes a1' et a2' le nuage de points est éclaté et permet d'affiner la représentation pour les traitements avec les Benzodiazépines testées :

Le traitement avec le Phénobarbital diffère assez nettement des autres traitements, ce qui confirme le résultat obtenu avec la figure X.

L'évolution des divers traitements avec les Benzodiazépines testées est assez spécifique de chacun d'eux, sans qu'aucun ne se détache toutefois de celle de la récupération.

Figure XI



- Les figures X et XI permettent de constater que les axes a2 et a2' opposent les paramètres biochimiques (GGTH et GGTP) d'un côté aux paramètres morphologiques de l'autre (FO, NO). Ces deux axes expriment aussi en grande partie l'évolution temporelle des divers traitements.

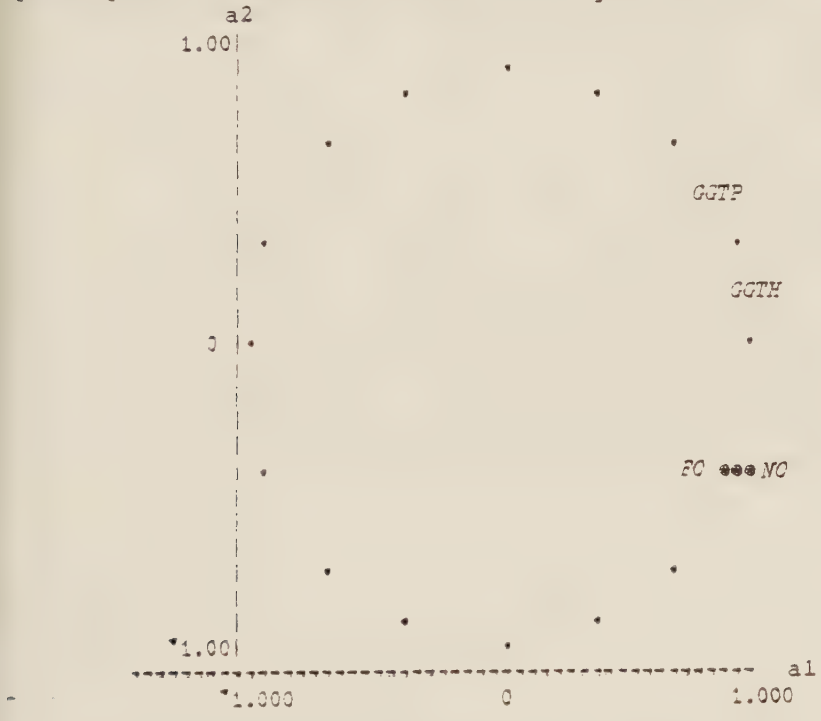
2. Corrélation des différents paramètres avec les axes a1 et a2.

Ces corrélations sont données dans le tableau XX suivant et la figure XII :

Tableau XXI

	Axe a1	Axe a2
GGT hépatique	0,964	0,227
GGT plasmatique	0,814	0,573
Foyers ou zones	0,875	-0,41
Nodules	0,896	-0,364

Figure XII : Cercle des corrélations entre les paramètres et les axes principaux d'inertie a1 et a2 de la figure X.



La forte corrélation des divers paramètres avec l'axe a1 (la corrélation étant maximum avec la GGT hépatique : 0,964) montre que les quatre paramètres décrivent d'un façon sensiblement équivalente les 79% de variance contenus dans l'axe a1, avec une légère supériorité pour la GGT hépatique.

3. Discussion :

Cette étude montre que les différents phénomènes d'initiation, de promotion et de récupération après initiation, peuvent être clairement différenciés à l'aide des quatre paramètres choisis combinés.

Parmi ces paramètres, la GGT hépatique est celui qui décrit le mieux l'axe a1. Il suffirait d'un autre des quatre paramètres pour déduire l'axe a2 et exprimer ainsi 96% de la variance. Ainsi l'analyse en composantes principales montre que deux paramètres bien choisis : GGT hépatique et nombre de foyers ou nombre de nodules, peuvent condenser l'information contenue dans le plan principal d'inertie, qui représente lui-même 96% de la variance de l'ensemble des données expérimentales.

Cette analyse montre que les différentes Benzodiazépines testées ont un comportement semblable à celui de la récupération et ne se superposent pas au promoteur (Phénobarbital) ni à l'initiateur (FAA). Ceci confirme les résultats précédents qui ont eu lieu sur les différents paramètres, mais de façon séparée. Cette analyse ne peut cependant pas se substituer aux études paramètre par paramètre, car elle ne donne qu'une représentation graphique sans interprétation statistique.

CONCLUSION

Les tests de cancérogénèse à moyen terme in vivo utilisés dans ces expérimentations se sont révélés conformes aux données déjà acquises et rapportées par la littérature.

Dans le cadre de ces expérimentations, de l'interprétation des lésions hépatiques et des analyses statistiques telles qu'elles ont été faites, nous pouvons conclure que les Benzodiazépines testées (Diazépam, Clorazépate dipotassique, Oxazépam, Lorazépam, CM 6912 et CM 7120) n'ont pas d'action carcinogène initiatrice ni promotrice.

De plus les examens pratiqués montrent qu'avant l'exploitation des critères morphologiques (foyers ou zones d'altérations cellulaires et nodules néoplasiques) , témoins du phénomène de cancérogénèse, le dosage de la gamma glutamyl transpeptidase plasmatique et hépatique permet d'apprécier l'établissement et l'intensité de ce phénomène.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
Rapporteur

Professeur VAN HAVERBEKE

Vu : le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

Vu : le Président de la thèse

Professeur COMBES

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 8 Mai 1981
Pour le Président de l'Université PAUL-SABATIER
et par délégation le Vice-Président

Professeur LARENG

BIBLIOGRAPHIE

(1) - AMES A.W., McCANN J., YAMASAKI E.- Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31, 347-364, 1975.

(2) - BANNASCH P.- Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. Cancer Research, 36, 2555-2562, 1976.

(3) - BUTLER W.H.- Long-term effects of phenobarbitone-Na on male Fischer rats. BR. J. CANCER, 37 (3), 418-423, 1978.

(4) - CAMERON R., KELLEN J., KOLIN A., MALKIN A., FARBER E.- Gamma-glutamyl transpeptidase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. Cancer Research, 38, 823-829, 1978.

(5) - FARBER E., PARKER S., GRUENSTEIN M.- The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens. Cancer Research, 36, 3879-3887, 1976.

(6) - FERON V.J., GRICE H.C., GRIESEMER R., PETO R.- Basic requirements for long-term assays for carcinogenicity. In : Long-term and short-term screening assays for carcinogens : A critical appraisal. IARC Monographs supplement 2, Lyon, 1980.

(7) - FIALA S., MOHINDRU A., KETTERING W.G., FIALA A.E., MORRIS H.P.- Gluathione and gamma glutamyl transpeptidase in rat during chemical carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst., vol 57, n° 3, 591-598, 1976.

(8) - Food and Drug Administration - Advisory Committee on Protocols for safety evaluation : Panel on carcinogenesis report on cancer testing in the safety evaluation of food additives and pesticides. Toxicol. Appl. Pharmacol., 20, 419-438, 1971.

(9) - GENEST J.- Diazepam and experimental tumor growth. The Lancet, June 16, 1306, 1979.

(10) - GRIESEMER R.A., SQUIRE R.A., STEWART H.L., CASEY H.W., MURPHY E.D., NIELSEN S.W., STANTON M.F.-Histologic typing of liver tumors of the rat. J. Natl. Cancer Inst., vol 64, n° 1, 178-206, 1980.

(11) - HAUSAMEN T.U., HELGER R., RICK W., GROSS W.- Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatases by a new kinetic method. Clin. chim. Acta, 15, 241-245, 1967.

(12) - HIROTA N., WILLIAMS G.M.- The sensitivity and heterogeneity of histochemical markers for altered foci involved in liver carcinogenesis. American Journal of Pathology, vol 95, n°2, 317-328, 1979.

(13) - HOROBIN D.F.- Diazepam as tumor promoter. The Lancet, January 31, 277, 1981.

(14) - HOROBIN D.F., GHAYUR T., KARMALI R.A.- Mind and cancer. The Lancet, May 5, 978, 1979.

(15) - International Agency for research on cancer (WHO). Long-term and short-term screening assays for carcinogens : A critical appraisal. IARC Monographs supplement 2, Lyon, 1980.

(16) - JACKSON M.R., HARRIS P.A.- Absence of effect of Diazepam on tumors. The Lancet, January 10, 104, 1981.

(17) - JACKSON M.R., HARRIS P.A.- Diazepam and tumor promotion. The Lancet, February 2, 445, 1981.

(18) - JEZEQUEL A.M., KOCH M., ORLANDI F.- A morphometric study of the endoplasmic reticulum in human hepatocytes. Gut 15, 737-747, 1974.

(19)- KARMEN A., WROBLEWSKI F., LADUE J.S.- Transaminase activity in human blood. J. Clin. Invest., 34, 126-131, 1955.

(20) - LAISHES B.A., OGAWA K., ROBERTS E., FARBER E.- Gamma glutamyl transpeptidase : a positive marker for cultured rat liver cells derived from putative premalignant and malignant lesions. J. Natl. Cancer Inst., vol 60, n° 5, 1009-1016, 1978.

(21) - LEBART, MORINEAU, FENELON - Traitement des données statistiques, Dunod, 1979.

(22) - LOEWENSTEIN W.R.- Junctional intercellular communication and the control of growth. Biochimica et Biophysica Acta, 560, 1-65,1979.

(23) MAZET F., EHRHART J.C.- Importance physiologique des jonctions communicantes. J. Physiol., Paris, 76, 529-549, 1980.

(24) MIGUET J.P., BERTHELOT P.- Lésions hépatiques d'origine médicamenteuse. La Revue du Praticien, 30, 35, 2317-2324, 1980.

(25) MURRAY A.W., FITZGERALD D.J.- Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 91, n° 2, 395-401, 1979.

(26) NEWBERNE P.M.- Experimental hepatocellular carcinogenesis. Cancer Research, 36, 2573-2578, 1976.

(27) OGAWA K., SOLT D.B., FARBER E.- Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis. Cancer Research, 40, 725-733, 1980.

(28) PERAINO C., FRY R.J.M., STAFFELDT E.F,- Effects of varying the onset and duration of exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-Acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis. Cancer Research, 37, 3623-3627, 1977.

(29) PERAINO C., STAFFELDT E.F., HAUGEN D.A., LOMBARD L.S., STEVENS F.J., FRY R.J.M.- Effects of varying the dietary concentration of phenobarbital on its enhancement of 2-Acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis. Cancer Research, 40, 3268-3273, 1980.

(30) - Pharmaceutical Manufacturers association - Guideliness for the assessment of drug and medical device safety in animals. February, 1977.

(31) - Proposition de directive du Conseil des Communautés Européennes concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives aux spécialités pharmaceutiques. J.O. des Communautés Européennes n° C355/1-28, 31.12.80.

(32) - PUGH T.D., GOLDFARB S.- Quantitative Histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-Acetylaminofluorene followed by phenobarbital. Cancer Research, 38, 4450-4457, 1978.

(33) - REUBER-M.D.- Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0.025 percent N-2-fluorenylacetamide. J. Natl. Cancer. Inst., vol 34, n° 6, 697-723, 1965.

(34) - SCHAUER A., KUNZE E.- Tumors of the liver in : Pathology of tumors in laboratory animals, vol I, part II - Turusov Ed. IARC Scientific Publication, Lyon, 41-72, 1979.

(35) - SCHERER E. and EMMELOT P.- Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis. Cancer Research, 36, 2544-2554, 1976.

(36) - SCHWARTZ D.- Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Troisième Edition, Flammarion Médecine-Sciences, 1963.

(37) - SELLS M.A., KATYAL S.L., SHINOZUKA H., ESTER L.W., SELL S., LOMBARDI B.- Isolation of oval cells and transitional cells from the livers of rats fed the carcinogen DL-ethonine. J. Natl. Cancer Inst., vol 66, n° 2, 355-362, 1981.

(38) - SQUIRE R.A., LEWITT M.H.- Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. Cancer Research, 35, 3214-3223, 1975.

(39) - SZASZ G.- A kinetic photometric method for gamma glutamyl transpeptidase. Clin. chem., 15, 124, 1969.

(40) - TATEMATSU M., MURASAKI G., NAKANISHI K., MIYATA Y., SHINOHARA Y., ITO N. Sequential quantitative studies on hyperplastic nodules in the liver of rats treated with carcinogenic chemicals. Gann, 70, 125-130, 1979.

(41) - TATEMATSU M., SHIRAI T., TSUDA H., MIYATA Y., SHINOHARA Y., ITO N.- Rapid production of hyperplastic liver nodules in rats treated with carcinogenic chemicals : a new approach for an in vivo short-term screening test for hepatocarcinogens. Gann 68, 499-507, 1977.

(42) - TSUDA H., LEE G., FARBER E.- Induction of resistant hepatocytes as a new principle for a possible short-term in vivo test for carcinogens. Cancer Research, 40, 1157-1164, 1980.

(43) - WATANABE K., WILLIAMS G.M.- Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by liver promoter phenobarbital : evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promoter acts on carcinogen-induced lesions. J. Natl. Cancer Inst., vol 61, n° 5, 1311-1314, 1978.

(44) - WEICHSELBAUM T.E.- An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am. J. Clin. Pathol., 16, 40-49, 1946.

(45) - WEISBURGER J.H., WILLIAMS G.M.- Chemical carcinogens. In : Casarett and Doull's Toxicology second Edition, chap. 6, 84-138, 1980.

(46) - WILLIAMS G.M.- Functionnal markers and growth behavior of preneoplastic hepatocytes. Cancer Research, 36, 2540-2543, 1976.

(47) - WILLIAMS G.M.- The detection of chemical mutagens/carcinogens by DNA repair and mutagenesis in liver cultures. In : Chemical Mutagens : Principles and methods for their detection, vol 6, New York, Plenum Press, 1980.

(48) - WILLIAMS G.M., KLAIBER M., PARKER S.E., FARBER E.- Nature of early appearing, carcinogen-induced liver lesions resistant to iron accumulation. J. Natl. Cancer Inst., vol 57, n° 1, 157-165, 1976.

(49) - WILLIAMS G.M., WATANABE K.- Quantitative kinetics of development of N-2-fluorenylacetamide-induced, altered (hyperplastic) hepatocellular foci resistant to iron accumulation and their reversion or persistance following removal of carcinogen. J. Natl. Cancer Inst., vol 61, n° 1, 113-121, 1978.

(50) - World Health Organisation - Principles for the testing and evaluation of drugs for carcinogenicity. WHO Tech. Rep. Ser. n° 426, Geneva.

(51) - WROBLEWSKI F., LADUE J.S.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 210-213, 1955.

(52) - ZAMPIGHI G., CORLESS J.M., ROBERTSON J.D.- On gap junction structure. The Journal of Cell Biology, vol 86, 190-198, 1980.